

PHARMAKOKINETIK UND PHARMAKODYNAMIK
VON PHENPROCOUMON IN RATTEN –
EINFLUSS VON SERUMPROTEINBINDUNG,
LEBENSALTER UND GESCHLECHT

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Dietmar Trenk
geb. in Udenhausen

Mainz 1980

**PHARMAKOKINETIK UND PHARMAKODYNAMIK
VON PHENPROCOUMON IN RATTEN –
EINFLUSS VON SERUMPROTEINBINDUNG,
LEBENSALTER UND GESCHLECHT**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

**Dietmar Trenk
geb. in Udenhausen**

Mainz 1980

PHARMAKOKINETIK UND PHARMAKODYNAMIK
VON PHENPROCOLON IN RATTEN -
EINFLUSS VON SERUMPROTEINBINDUNG
LEBENSALTER UND GESCHLECHT

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“



Dekan: Prof. Dr. F. Moll
Berichterstatter: Prof. Dr. E. Jähnchen
Prof. Dr. F. Moll

Tag der mündlichen Prüfung: 1.7.1980

Diese Arbeit wurde im Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz (Geschäfts-
führender Direktor: Prof. Dr. E. Muscholl) in der
Zeit von Januar 1977 bis Mai 1980 angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. E. Jähnchen

für die Vergabe der Arbeit und seine
jederzeitige Hilfsbereitschaft bei
der Bearbeitung der Problematik.

Herrn Prof. Dr. F. Moll

bin ich für die Unterstützung und
Betreuung der Arbeit im Fachbereich
Pharmazie zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. ERGEBNISSE	8
1. Einfluß der Serumproteinbindung auf Pharmakokinetik und gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon	8
1.1. Pharmakokinetik und Wirksamkeit von Phen- procoumon in Ratten mit endogenen inter- individuellen Unterschieden in der Serumproteinbindung	8
1.2. Pharmakokinetik und Wirksamkeit von Phenprocoumon in Ratten unter dem Ein- fluß des verdrängenden Pharmakons Tolbutamid	21
2. Der Einfluß des Lebensalters auf Pharma- kokinetik und gerinnungshemmende Wirk- samkeit von Phenprocoumon	30
2.1. Pharmakokinetik und Wirksamkeit von Phenprocoumon in jungen und alten männlichen Ratten	30
2.2. Der Einfluß von Phenprocoumon auf den Vitamin K ₁ -Epoxid-Zyklus in jungen und alten männlichen Ratten	36
3. Der Einfluß des Geschlechtes auf Pharma- kokinetik und gerinnungshemmende Wirk- samkeit von Phenprocoumon	44
3.1. Pharmakokinetik und Wirksamkeit von Phenprocoumon in männlichen und weib- lichen Ratten	44
3.2. Der Einfluß von Phenprocoumon auf den Vitamin K ₁ -Epoxid-Zyklus in männlichen und weiblichen Ratten	52

III. DISKUSSION

Der Einfluß der Serumproteinbindung auf Pharmakokinetik und gerinnungshemmende Wirk- samkeit von Phenprocoumon	59
Der Einfluß des Lebensalters auf Pharmako- kinetik und gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon	70
Der Einfluß des Geschlechtes auf Pharmako- kinetik und gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon	77

IV. ZUSAMMENFASSUNG 84

V. EXPERIMENTELLER TEIL 90

1. Versuchstiere	90
2. Arzneimittel	91
3. Verabreichung der Arzneimittel	91
4. Probengewinnung	92
5. Bestimmung der Prothrombinkomplex- aktivität	95
6. Arzneimittelanalyse	97
7. Bestimmung der Proteinbindung	107
8. Proteinbestimmung	109
9. Substanzen, Lösungsmittel, Puffer	111
10. Pharmakokinetische Analyse	113
11. Statistische Auswertung	120

VI. LITERATURVERZEICHNIS 121

I. E I N L E I T U N G

Die oralen Antikoagulantien vom Cumarin-Typ, wie z.B. Phenprocoumon, Dicumarol und Warfarin (Abbildung 1), werden klinisch zur Prophylaxe und zur Therapie thrombo-embolischer Erkrankungen verwendet. Die therapeutische Breite dieser Pharmaka ist gering, dadurch sind Über- und Unterdosierungen im Laufe der Therapie häufig. So sollen Blutungen unter einer Therapie mit Cumarinderivaten in 5 - 25 % der behandelten Patienten auftreten; die Gesamtmortalität als Folge solcher Blutungen wurde in einem großen Patientenkollektiv mit 0,3 % pro Jahr angegeben (Loeliger, 1975). Die Schwierigkeiten einer optimalen Einstellung ergeben sich unter anderem aus der geringen therapeutischen Breite dieser Arzneimittel, aus den zum Teil erheblichen inter- und intraindividuellen Variationen in der Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen, sowie aus zahlreichen endogenen und exogenen Faktoren, die die Wirksamkeit der oralen Antikoagulantien beeinflussen können.

Das Studium dieser Pharmaka erscheint aber nicht nur aus klinisch-praktischen Gesichtspunkten bedeutungsvoll. Die oralen Antikoagulantien haben infolge ihrer gut quantifizierbaren Wirkung außerdem auch in der experimentellen Pharmakologie als Modellsubstanzen großes Interesse erlangt. Die Erkenntnisse über die Beziehung zwischen Pharmakokinetik und Wirksamkeit, die anhand dieser Arzneimittel gewonnen werden konnten, gelten vielmehr auch für andere reversibel

wirkende Pharmaka mit vergleichbaren pharmakokinetischen Eigenschaften (saure Substanzen mit hoher Serumproteinbindung, überwiegend hepatischer Elimination und geringer hepatischer Extraktion).

Von entscheidender Bedeutung für das Studium der oralen Antikoagulantien ist weiterhin, daß Ratten ein geeignetes Tiermodell darstellen, mit dem sich viele beim Menschen beobachtete, durch exogene oder endogene Faktoren bedingte, Änderungen in der Ansprechbarkeit qualitativ nachvollziehen lassen. Damit eröffnen sich hier die Möglichkeiten einer detaillierten Analyse z.B. von Arzneimittelwechselwirkungen, von interindividuellen Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber diesen Arzneimitteln, oder der Beeinflussung der Wirksamkeit durch einzelne physiologische Variable (wie z.B. das Lebensalter).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, inwieweit sich männliche Auszucht-Sprague-Dawley-Ratten hinsichtlich der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik von Phenprocoumon unterscheiden. Aus der Literatur ist bekannt, daß sich diese Ratten insbesondere durch große interindividuelle Unterschiede in der Serumproteinbindung von oralen Antikoagulantien auszeichnen (Levy und Yacobi, 1974; Yacobi und Levy, 1975; Slattey et al., 1976; Lai und Levy, 1977; Yacobi und Levy, 1977). Deshalb sollte hier speziell studiert werden, ob und in welchem Ausmaß eine Änderung der

Serumproteinbindung mit einer gleichzeitigen Änderung in der Wirksamkeit einhergeht.

Die ursprüngliche Vorstellung geht davon aus, daß die freie Konzentration eines Arzneimittels im Serum mit der freien Konzentration des Pharmakons am Rezeptor im Gleichgewicht steht, und daß eine Erhöhung der freien Konzentration im Serum somit auch eine Zunahme der Wirksamkeit nach sich zieht (Brodie, 1965).

Es wurden dann zahlreiche Arzneimittelwechselwirkungen insbesondere mit oralen Antikoagulantien beobachtet, und der zugrundeliegende Mechanismus – im Falle einer Wirkungsverstärkung – mit einer Verdrängung von oralen Antikoagulantien aus ihrer Serumproteinbindung erklärt (Aggeler et al., 1967; O'Reilly und Aggeler, 1970; Coon and Willis, 1970; Sellers und Koch-Weser, 1971; Sellers et al., 1973). Diese Annahme basierte in erster Linie auf Bindungsuntersuchungen *in vitro*, bei denen eine solche Verdrängung nachweisbar war. Der kausale Zusammenhang zwischen den *in vitro*-Befunden und der *in vivo* beobachteten Wirkungsverstärkung ist nicht notwendigerweise zwingend.

Andere Autoren postulierten, daß eine Verdrängung von oralen Antikoagulantien aus ihrer Serumproteinbindung nur zu einer passageren Zunahme der Wirkung führt, da sich nach Erreichen des Steady-state-Zustandes unter dem Einfluß des verdrängenden Pharmakons die gleiche Plasmakonzentration an freiem, nicht gebundenem Arzneimittel einstellt wie vor

der Verabreichung des verdrängenden Pharmakons (Koch-Weser und Sellers, 1971). Hierbei wurde angenommen, daß die Zunahme der freien Konzentration im Serum mit einer gleichzeitigen Zunahme der Eliminationsgeschwindigkeit einhergeht, und daß es dadurch zu einer Abnahme der Steady-state-Konzentration an Gesamtarzneimittel (frei plus gebunden) im Serum kommt. Somit sollte - trotz erhöhtem freiem Anteil - die freie Konzentration des Arzneimittels nach Erreichen des Steady-state-Serumspiegels unbeeinflusst bleiben. Diese Vorstellung wurde durch Ergebnisse, die für Diphenylhydantoin an Patienten mit Hypoalbuminaemie erhoben wurden (Gugler und Azarnoff, 1976), experimentell gestützt.

Computersimulationen von Levy (1976) ergaben, daß die durchschnittliche freie Konzentration eines Arzneimittels durch Änderungen der Serumproteinbindung unbeeinflusst bleibt. Jedoch ging eine Abnahme der Serumproteinbindung mit höheren maximalen und niedrigeren minimalen Serumspiegeln der freien Konzentration einher. Der Autor folgerte daraus, daß die höheren Konzentrationsspitzen an freiem Arzneimittel eine Wirkungsverstärkung nach sich ziehen könnten.

In keiner der bisher vorliegenden Untersuchungen wurde der Einfluß einer Änderung der Serumproteinbindung auf die Wirksamkeit experimentell nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem zum einen in Auszucht-Sprague-Dawley-Ratten, die eine offenbar gene-

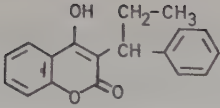
tisch bedingte, unterschiedliche Serumproteinbindung für Phenprocoumon aufweisen (Abbildung 2), untersucht. Zum anderen wurde in Inzucht-Lewis-Ratten, die sich hinsichtlich der Pharmakokinetik und der Wirksamkeit von Phenprocoumon homogen verhalten, die Serumproteinbindung von Phenprocoumon durch gleichzeitige Behandlung der Tiere mit Tolbutamid modifiziert. Aus *in vitro*-Versuchen war bekannt, daß dieses Pharmakon Phenprocoumon aus seiner Serumproteinbindung verdrängt.

In beiden Untersuchungen wurde gleichzeitig die Pharmakokinetik (von freiem und gesamtem Phenprocoumon) und der Zeitverlauf der gerinnungshemmenden Wirkung gemessen und miteinander korreliert.

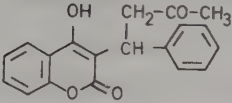
Weiterhin sollte untersucht werden, welche Faktoren für die erhöhte Ansprechbarkeit gegenüber oralen Antikoagulantien mit fortschreitendem Lebensalter verantwortlich sind. Eine altersabhängige Zunahme der Wirksamkeit oraler Antikoagulantien wurde sowohl im Menschen als auch in der Ratte nachgewiesen (Husted und Andreasen, 1977; Shephard et al, 1977; Routledge et al., 1979). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Zunahme in der Empfindlichkeit mit fortschreitendem Alter sind bisher nicht bekannt. Es bietet sich daher an, dieses Problem im Tiermodell zu untersuchen. Hier besteht insbesondere die Möglichkeit, den Einfluß der oralen Antikoagulantien auf den Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus in der Leber

zu studieren, da dieser nach neueren Erkenntnissen eng mit der Wirksamkeit dieser Pharmaka verknüpft ist (Bell und Matschiner, 1972; Willingham und Matschiner, 1974; Ren et al., 1974; Whitlon et al., 1978).

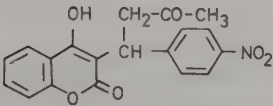
Desweiteren sollte untersucht werden, welche Faktoren für die Geschlechtsunterschiede in der Wirksamkeit oraler Antikoagulantien verantwortlich sind. Während kontrollierte Untersuchungen am Menschen bisher nicht vorliegen, wurden für die Ratte solche Geschlechtsunterschiede beschrieben (Hagan und Radomski, 1953; Pyörälä, 1965; Pyörälä, 1968). Bisher fehlt jedoch eine genaue Analyse der hierfür verantwortlichen Mechanismen.



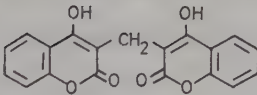
Phenprocoumon



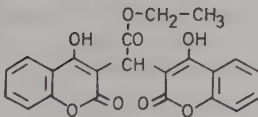
Warfarin



Acenocoumarol



Dicumarol



Äthylbiscoumacetat

Abb. 1: Strukturformeln der Cumarinderivate

II. E R G E B N I S S E

1. EINFLUSS DER SERUMPROTEINBINDUNG AUF PHARMAKOKINETIK UND GERINNUNGSHEMMENDE WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON

1.1. PHARMAKOKINETIK UND WIRKSAMKEIT IN RATTEN MIT ENDOGENEN INTERINDIVIDUELLEN UNTERSCHIEDEN IN DER SERUMPROTEINBINDUNG

In einem "Screening"-Versuch wurde zunächst bei 150 männlichen Sprague-Dawley-Ratten die Schwanzarterie punktiert und ca. 4 ml Blut entnommen. Im daraus gewonnenen Serum wurde die Proteinbindung von Phenprocoumon gemessen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 2 in Form eines Häufigkeits-Verteilungs-Diagrammes dargestellt. Es bestehen beträchtliche interindividuelle Unterschiede im Ausmaß der Serumproteinbindung von Phenprocoumon. Der freie prozentuale Anteil reicht von 0,45 bis 2,04 %. Das Verteilungsmuster deutet eher auf eine multimodale als auf eine unimodale (d.h. Gauß'sche) Verteilung hin, jedoch reichte die Anzahl der Tiere zu einer statistischen Absicherung dieser Aussage nicht aus. Die Unterschiede im freien prozentualen Anteil von Phenprocoumon lassen sich weder mit Unterschieden im Gesamtproteingehalt ($r = 0,05$; $p > 0,05$) noch im Albumingehalt ($r = 0,06$; $p > 0,05$) der Seren erklären.

Im weiteren wurden 25 Tiere mit unterschiedlicher Serumpro-

teinbindung selektiert und einer detaillierten pharmakokinetischen Analyse unterzogen. Hierzu wurde diesen Tieren eine Dosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Tritium-markiertes Phenprocoumon intravenös injiziert und in allen Tieren die Eliminationskinetik von Phenprocoumon, die Verteilung zwischen Plasma und Leber, die Bindung im Serum und in der Leber sowie der Zeitverlauf der gerinnungshemmenden Wirkung gemessen.

Eliminationskinetik

Die untersuchten Ratten unterscheiden sich im Ausmaß der Serumproteinbindung von Phenprocoumon mit einem freien Anteil von 0,53 bis 1,45 %. Die Bindungswerte, die am Ende des Versuches im Serum des Blutes der Baucharterie gemessen wurden, unterscheiden sich nur unwesentlich von den Werten, die im Serum aus der Schwanzarterie bestimmt wurden ($r = 0,89$; $p < 0,001$).

Bei monoexponentiellem Verlauf der Plasmakonzentration von Phenprocoumon bestehen nahezu zweifache Unterschiede in der Eliminationshalbwertszeit von Phenprocoumon (von 15,98 bis 30,00 Stunden) mit einer strengen Korrelation ($r = 0,77$; $p < 0,001$) zwischen apparenter Eliminationskonstante k_{app} und dem freien Anteil von Phenprocoumon im Serum (Abbildung 3). Gleiches gilt für die Plasmaclearance: Je höher der freie Anteil im Serum, um so größer ist die Clearance, wobei die errechnete Regressionsgerade ($r = 0,55$; $p < 0,01$) annähernd durch den Nullpunkt des Koordinatensystems

geht (Abbildung 4). Auch hinsichtlich des fiktiven Verteilungsvolumens von Phenprocoumon bestehen beträchtliche Unterschiede mit Werten zwischen 242 und 908 ml $\cdot$ kg⁻¹ (Mittelwert 426 ± 156 ml $\cdot$ kg⁻¹), ohne daß sich jedoch eine statistisch signifikante Beziehung zum freien Anteil im Serum ergibt ($r = 0,38$; $p < 0,05$).

Verteilung zwischen Plasma und Leber

Zwischen dem freien Anteil von Phenprocoumon im Serum und dem Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis besteht eine strenge Korrelation ($r = 0,85$; $p < 0,001$). Wie in Abbildung 5 gezeigt, haben Ratten mit den höchsten freien Anteilen im Serum ein mehr als dreimal höheres Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis als Ratten mit geringen freien Anteilen; die errechnete Regressionsgerade geht praktisch durch den Nullpunkt des Koordinatensystems. Es bestehen dementsprechend ebenfalls positive, lineare, statistisch signifikante Korrelationen zwischen Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis und der apparenten Eliminationskonstante k_{app} ($r = 0,85$; $p < 0,001$) sowie der Plasmaclearance ($r = 0,72$; $p < 0,001$). Errechnet man den Anteil der Dosis von Phenprocoumon, der sich initial in der Leber befindet, so zeigt sich auch hier eine Abhängigkeit von der Serumproteinbindung ($r = 0,56$; $p < 0,01$).

Der freie prozentuale Anteil von Phenprocoumon und die freie Konzentration von Phenprocoumon in der Leber wurden

experimentell durch Gleichgewichtsdialyse von 1 : 4 verdünntem Leberhomogenat bestimmt. Außerdem wurde die freie Konzentration in der Leber rechnerisch aus der Gesamtkonzentration in der Leber und im Serum sowie aus dem freien Anteil im Serum ermittelt (Levy et al., 1978). Hierbei wird zugrunde gelegt, daß die freie Konzentration im Serumwasser identisch mit der freien Konzentration im Gewebwasser ist. Es zeigt sich, daß sowohl die im Leberhomogenat gemessenen Werte mit freien prozentualen Anteilen von 4,50 bis 9,30 % (Mittelwert $7,00 \pm 1,40$ %) als auch die errechneten Werte (freier prozentualer Anteil von 0,096 bis 0,185 %; Mittelwert $0,131 \pm 0,026$ %) annähernd zweifache Unterschiede aufweisen, ohne daß sich eine Beziehung mit dem freien Anteil im Serum nachweisen läßt ($r = 0,07$ bzw. $r = 0,26$; $p > 0,05$). Dagegen besteht eine positive, lineare Korrelation ($r = 0,83$; $p < 0,001$) zwischen den gemessenen freien Konzentrationen von Phenprocoumon in der Leber und im Serum (Abbildung 6). Bei den errechneten Werten ist dies eine der zugrundeliegenden Annahmen - eine Korrelation ist zwangsläufig.

Gerinnungshemmende Wirksamkeit

Zur Beurteilung und quantitativen Erfassung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit von Phenprocoumon wurden unterschiedliche Parameter herangezogen.

Zum einen wurde die Gesamtplasmakonzentration von Phenpro-

coumon (C_p 50 %) ermittelt, die eine 50 %-ige Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes ($R_{syn}/R_{syn}^O = 0,5$) zur Folge hat. Es zeigt sich, daß in den untersuchten Ratten nahezu achtfache Unterschiede in diesen C_p 50 %-Werten vorhanden sind. Die C_p 50 %-Werte zeigen eine statistisch signifikante, negative Korrelation mit dem freien Anteil im Serum ($r = -0,85$; $p < 0,001$; Abbildung 7) und dem Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis ($r = -0,81$; $p < 0,001$).

Demnach ist in Ratten mit geringerem freiem Anteil von Phenprocoumon im Serum eine höhere Gesamtplasmakonzentration und ein höheres Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis von Phenprocoumon für eine 50 %-ige Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes erforderlich als in Ratten mit größerem freiem Anteil von Phenprocoumon im Serum.

Die interindividuellen Unterschiede in den C_p 50 %-Werten von freiem, nicht gebundenem Phenprocoumon (ein Maß für die intrinsische gerinnungshemmende Aktivität) weisen bei einem Bereich von $0,98$ bis $3,56 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ demgegenüber nur etwa dreifache Unterschiede auf.

Zum anderen wurde als weiterer Parameter zur Beurteilung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit die Wirkung pro Dosis ermittelt. Ein geeignetes Maß hierfür ist die Fläche über der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) vs. Zeit-Kurve (Abbildung 8). Die geringen Unterschiede (etwa 1,8-fach) in den Flächen dürften in erster Linie Unterschiede in der intrinsischen Wirksamkeit widerspiegeln, da sich auch

eine signifikante Korrelation ($r = -0,46$; $p < 0,05$) dieser Flächen mit den C_p 50 %-Werten von freiem, nicht gebundenem Phenprocoumon ergibt.

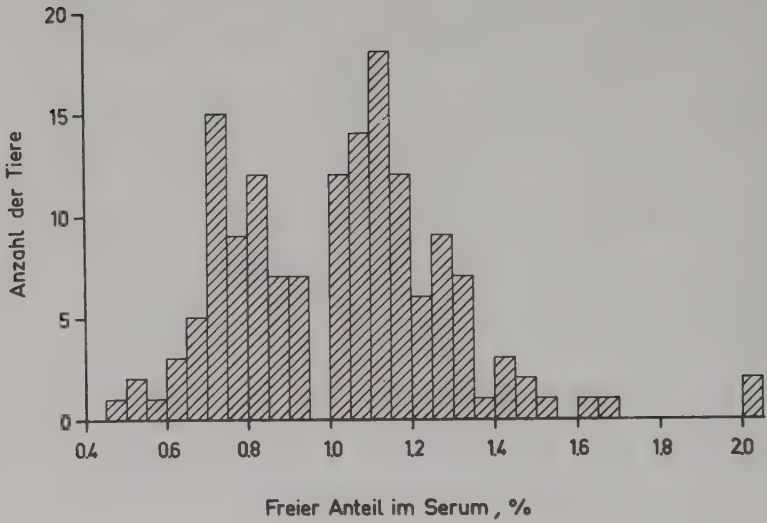


Abb. 2: Häufigkeits-Verteilungs-Diagramm des freien Anteils von Phenprocoumon im Serum von 150 männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Die Serumproteinbindung wurde bei einer zugesetzten Phenprocoumonkonzentration von $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ bestimmt.

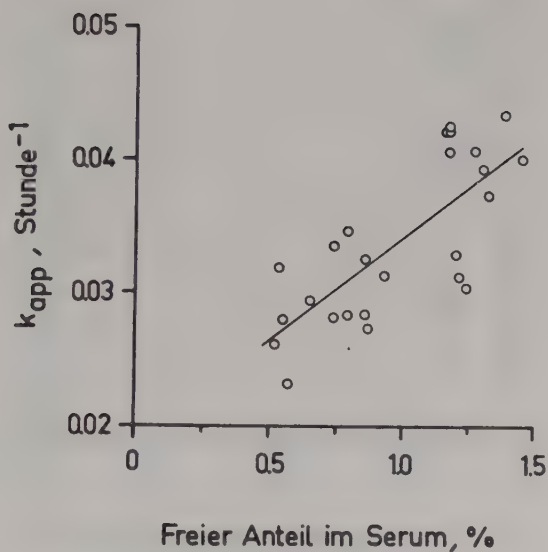


Abb. 3: Beziehung zwischen dem freien Anteil im Serum und der apparenten Eliminationskonstante (k_{app}) von Phenprocoumon nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon ($r = 0,77$, $p < 0,001$; Anzahl der Tiere $n = 25$).

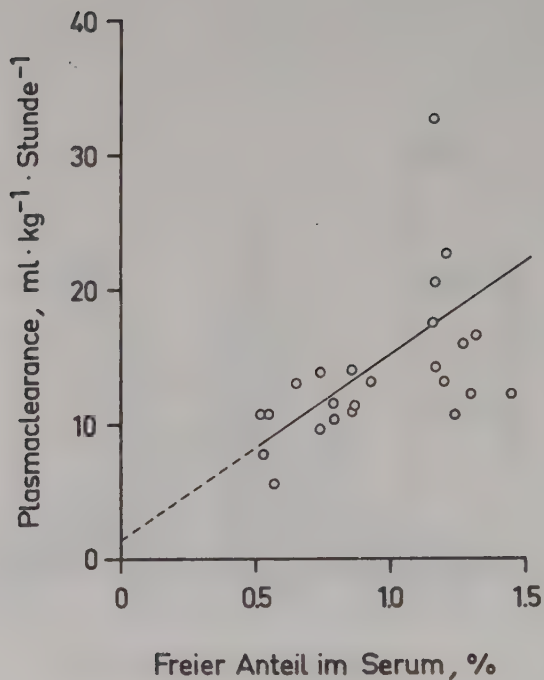


Abb. 4: Beziehung zwischen dem freien Anteil im Serum und der Plasmaclearance von Phenprocoumon nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon ($r = 0,55$, $p < 0,01$; Anzahl der Tiere $n = 25$).

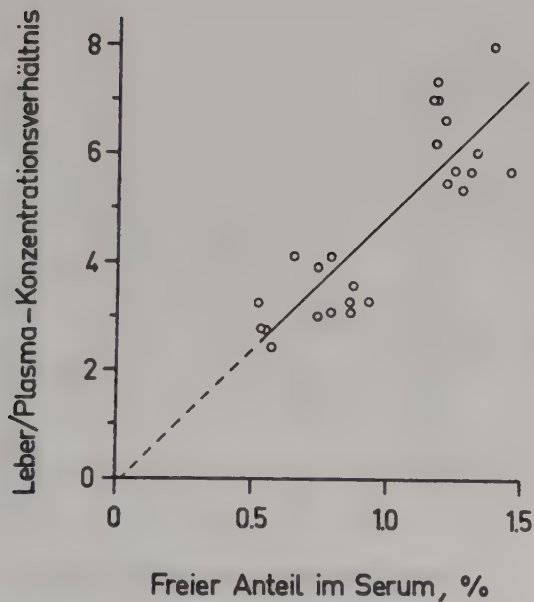


Abb. 5: Beziehung zwischen dem freien Anteil im Serum und dem Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis von Phenprocoumon nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($r = 0,85$, $p < 0,001$; Anzahl der Tiere $n = 25$).

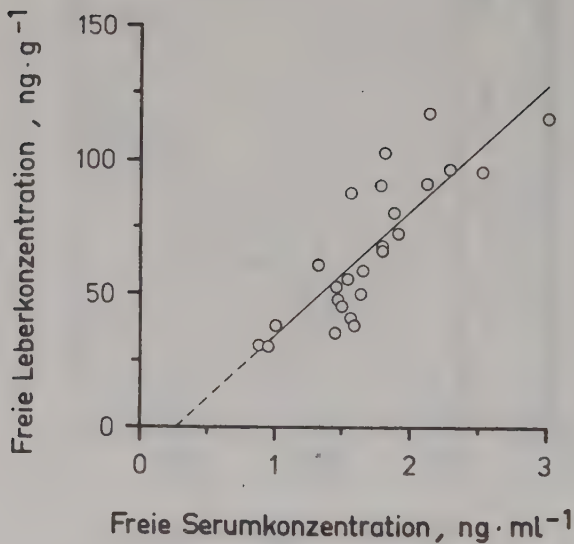


Abb. 6: Beziehung zwischen der freien Phenprocoumonkonzentration in der Leber (errechnet aus den im verdünnten Leberhomogenat (1 : 4, w/w) gemessenen Bindungswerten) und der freien Phenprocoumonkonzentration im Serum 48 Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon ($r = 0,83$, $p < 0,001$; Anzahl der Tiere $n = 25$).

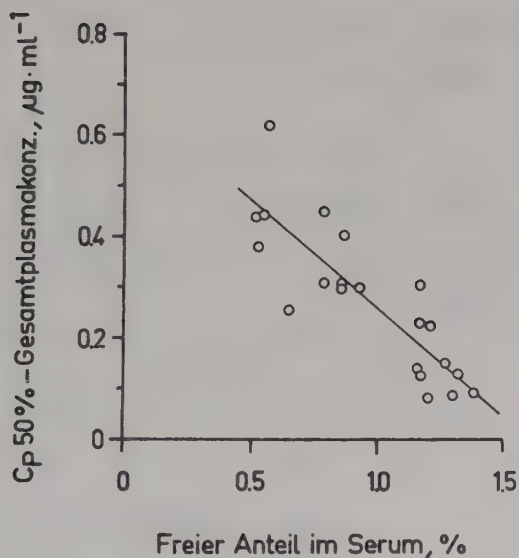


Abb. 7: Beziehung zwischen dem freien Anteil im Serum und der halbeffektiven Plasmakonzentration von Gesamtphenprocoumon (C_p 50 %) nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon ($r = -0,85$, $p < 0,001$; Anzahl der Tiere $n = 21$).

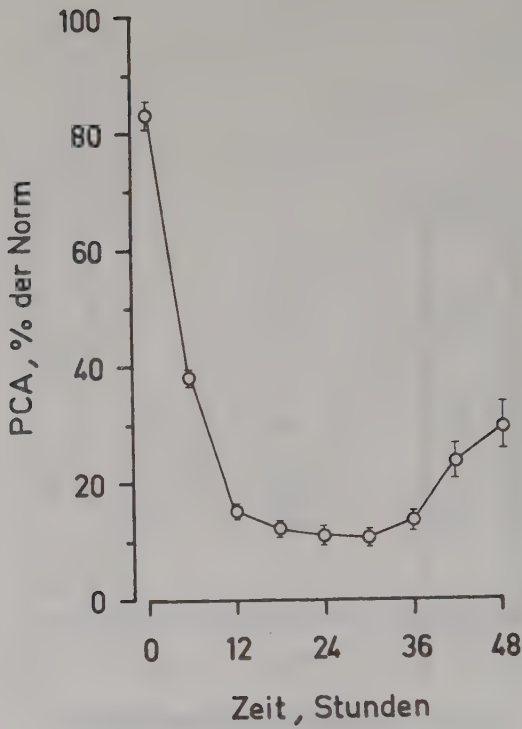


Abb. 8: Zeitverlauf der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) im Plasma nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon (Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes; Anzahl der Tiere $n = 25$).

1.2. PHARMAKOKINETIK UND WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUNON IN RATTEN UNTER DEM EINFLUSS DES VERDRÄNGENDEN PHARMA- KONS TOLBUTAMID

In diesem Versuch sollte die Serumproteinbindung von Phenprocoumon durch gleichzeitige Verabreichung von Tolbutamid verändert werden.

In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, daß Tolbutamid Phenprocoumon aus der Serumproteinbindung verdrängt (Abbildung 9). Das Ausmaß der Verdrängung ist im gemessenen Bereich von $50 - 400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Tolbutamid abhängig von dessen jeweiliger Serumkonzentration aber unabhängig von der vorhandenen Phenprocoumonkonzentration im Serum (Abbildung 9).

Eliminationskinetik

Unter der gleichzeitigen Behandlung mit Tolbutamid (mittlere Plasmakonzentration $136 \pm 12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) kommt es zu einer Verdoppelung des freien Anteiles von Phenprocoumon im Serum (Tabelle 1). Die Zeitverläufe der Plasmakonzentrationen von Tolbutamid sowie von freiem und Gesamtphenprocoumon in Kontrollratten und mit Tolbutamid behandelten Ratten nach einer intravenös verabreichten Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon sind als Mittelwertskurven in Abbildung 10 dargestellt. Der höchste Tolbutamid-Plasmaspiegel von ca. $400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ zu Beginn des Versuches wur-

de eine Stunde nach Verabreichung der Bolusdosis bestimmt. Die aufgezeigten Schwankungen im Plasmaspiegel beruhen auf den unterschiedlichen Abnahmezeiten während des Tolbutamid-Dosierungsintervalles und der kurzen Halbwertszeit von Tolbutamid in Ratten (ca. 3 Stunden).

In mit Tolbutamid behandelten Ratten ist die biologische Halbwertszeit von Phenprocoumon deutlich verkürzt und die initiale Plasmakonzentration niedriger (Abbildung 10; Tabelle 1). Die extrapolierten initialen Plasmakonzentrationen von freiem Phenprocoumon sind unter dem Einfluß von Tolbutamid höher, während die 54-Stunden-Werte niedriger als in der Kontrollgruppe sind (Abbildung 10; Tabelle 1).

Durch die gleichzeitige Gabe von Tolbutamid kommt es zu einem Anstieg des fiktiven Verteilungsvolumens und zu einer Verdoppelung der Plasmaclearance, während die intrinsische Clearance unverändert bleibt (Tabelle 1).

Verteilung zwischen Plasma und Leber

Die Behandlung mit Tolbutamid führt zu einer Verdoppelung des Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnisses von Phenprocoumon (Tabelle 2). Der Dosisanteil von Phenprocoumon, der sich initial in der Leber befindet, ist in der mit Tolbutamid behandelten Gruppe etwas größer als in der Kontrollgruppe (Tabelle 2). Dieser Unterschied läßt sich aber statistisch nicht sichern.

In den errechneten oder gemessenen freien Konzentrationen

von Phenprocoumon im Lebergewebe bzw. Leberhomogenat bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 2). Auch das relative oder absolute Lebergewicht der Ratten wurde durch die Behandlung mit Tolbutamid nicht verändert (Tabelle 2).

Gerinnungshemmende Wirksamkeit

Die C_p 50 %-Werte (Plasmakonzentration bei der $R_{syn}/R_{syn}^0 = 0,5$) von Gesamtphenprocoumon sind in den mit Tolbutamid behandelten Ratten niedriger als in den Kontrollratten, während sich keine Unterschiede in bezug auf die C_p 50 %-Werte von freiem Phenprocoumon (d.h. in der intrinsischen gerinnungshemmenden Aktivität) zeigen (Tabelle 3).

Der Zeitverlauf der gerinnungshemmenden Wirkung ist im Mittel für beide Gruppen in Abbildung 11 dargestellt. Die Flächen über den Kurven als Maß der Wirkung pro Dosis sind jedoch nicht statistisch signifikant verschieden (Tabelle 3). Auch die stärkere maximale Wirkung nach 18 Stunden sowie das scheinbar schnellere Abklingen der Wirkung (Abbildung 11) läßt sich statistisch nicht sichern.

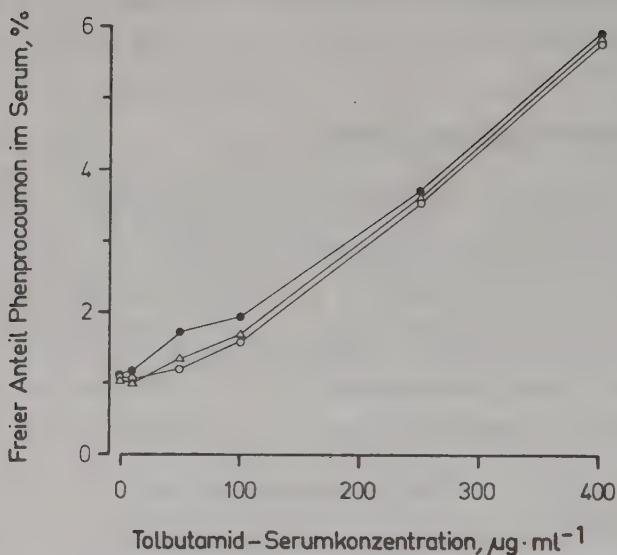


Abb. 9: Einfluß der Serumkonzentration von Tolbutamid auf den freien Anteil von Phenprocoumon im Serum, gemessen bei einer Serumkonzentration von $0,022 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (o), $0,106 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (●) und $0,317 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Δ) Phenprocoumon. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert von zwei Dialyseexperimenten.

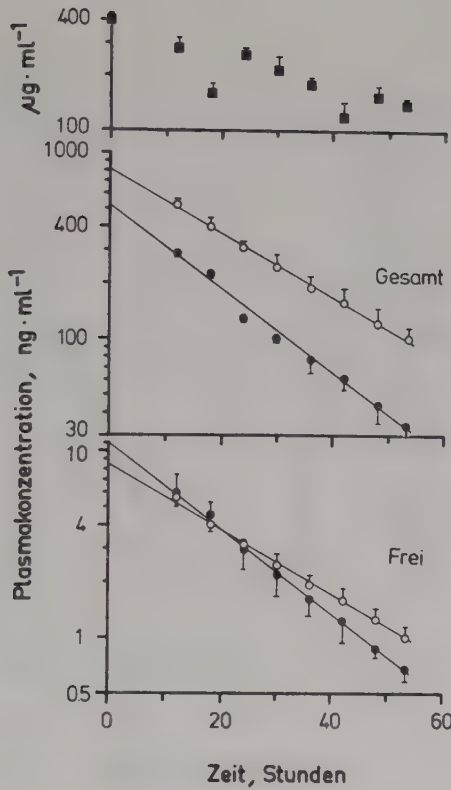


Abb. 10: Zeitverlauf der Plasmakonzentration von freiem und Gesamtphenprocoumon nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon in Kontrollratten (o) und Ratten, die gleichzeitig mit Tolbutamid behandelt wurden (●). Tolbutamidkonzentration im Plasma (■). (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, Anzahl der Tiere $n = 4$).

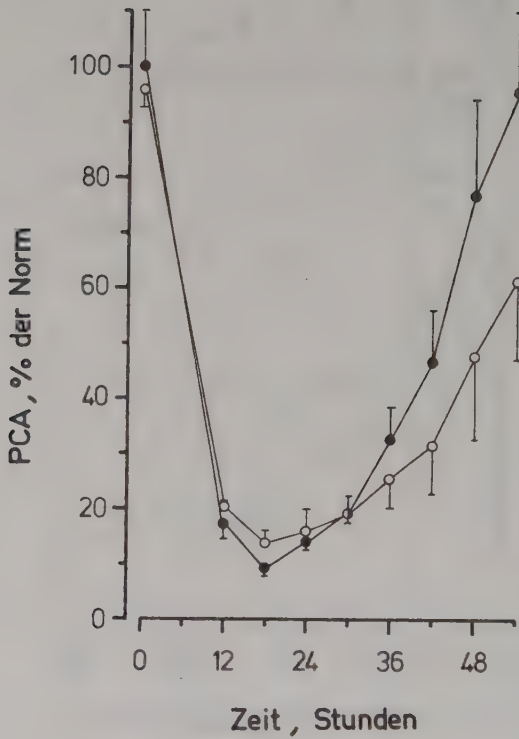


Abb. 11: Zeitverlauf der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) im Plasma nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon in Kontrollratten (o) und Ratten, die gleichzeitig mit Tolbutamid behandelt wurden (●). (Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes; Anzahl der Tiere $n = 4$).

Tabelle 1: Einfluß von Tolbutamid auf die Eliminationskinetik von Phenprocoumon
(Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 4)

Parameter	Kontrolle	Tolbutamid	t-Test ^a
Freier Anteil im Serum (% der Gesamtkonz.)	1,03 $\pm$ 0,15	2,01 $\pm$ 0,35	p < 0,005
Biologische Halbwertszeit (Stunden)	17,4 $\pm$ 1,3	13,3 $\pm$ 1,5	p < 0,01
Fiktives Verteilungsvolumen (ml $\cdot$ kg ⁻¹)	430 $\pm$ 37	635 $\pm$ 109	p < 0,05
Plasmaclearance (ml $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ Stunde ⁻¹)	16,7 $\pm$ 2,1	31,2 $\pm$ 2,5	p < 0,001
Intrinsische Clearance (ml $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ Stunde ⁻¹)	1627 $\pm$ 147	1606 $\pm$ 373	NS
Apparente Eliminationskonstante (Stunde ⁻¹)	0,0399 $\pm$ 0,0030	0,0528 $\pm$ 0,0061	p < 0,01
Extrapolierte freie Plasmakonz., t = 0 (ng $\cdot$ ml ⁻¹)	8,20 $\pm$ 0,49	11,22 $\pm$ 3,29	NS
Gemessene freie Plasmakonz., t = 54 Std. (ng $\cdot$ ml ⁻¹)	0,85 $\pm$ 0,10	0,65 $\pm$ 0,06	p < 0,05

^a Unterschiede zwischen Kontrollratten und Ratten, die mit Tolbutamid behandelt wurden

Tabelle 2: Einfluß von Tolbutamid auf die Verteilung von Phenprocoumon zwischen Plasma und Leber (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 4)

Parameter	Kontrolle	Tolbutamid	t-Test ^a
Lebergewicht (g)	9,08 $\pm$ 0,67	9,29 $\pm$ 0,43	NS
Lebergewicht (% des Körpergewichtes)	2,58 $\pm$ 0,05	2,70 $\pm$ 0,13	NS
Leber/Plasma-Konzentrations- verhältnis	5,90 $\pm$ 1,30	11,10 $\pm$ 1,00	p < 0,001
Dosisanteil in der Leber	0,33 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,14	NS
Freier Anteil in der Leber, gemessen ^b (% der Gesamtkonz.)	4,3 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 1,1	NS
Freie Konz. in der Leber, gemessen ^b (ng $\cdot$ g ⁻¹)	22,2 $\pm$ 6,0	24,5 $\pm$ 4,2	NS
Freier Anteil in der Leber, errechnet ^c (% der Gesamtkonz.)	0,107 $\pm$ 0,017	0,115 $\pm$ 0,011	NS
Freie Konz. in der Leber, errechnet ^c (ng $\cdot$ g ⁻¹)	0,60 $\pm$ 0,07	0,61 $\pm$ 0,14	NS

^a Unterschiede zwischen Kontrollratten und Ratten, die mit Tolbutamid behandelt wurden

^b ermittelt mittels Gleichgewichtsdialyse von Leberhomogenat (1 : 4)

^c ermittelt nach Levy et al., 1978

Tabelle 3: Einfluß von Tolbutamid auf die gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 4)

Parameter	Kontrolle	Tolbutamid	t-Test ^a
C _p 50 %, Gesamtkonzentration (ng · ml ⁻¹)	179,6 $\pm$ 35,5	89,4 $\pm$ 10,8	p < 0,005
C _p 50 %, freie Konzentration (ng · ml ⁻¹)	1,81 $\pm$ 0,40	1,78 $\pm$ 0,21	NS
Fläche über der PCA vs. Zeit-Kurve (% der Norm · Stunden)	3317 $\pm$ 538	3148 $\pm$ 683	NS

^a Unterschiede zwischen Kontrollratten und Ratten, die mit Tolbutamid behandelt wurden

2. DER EINFLUSS DES LEBENSALTERS AUF PHARMAKOKINETIK UND GERINNUNGSHEMMENDE WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON

2.1. PHARMAKOKINETIK UND WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON IN JUNGEN UND ALTEN MÄNNLICHEN RATTEN

Eliminationskinetik

Nach Verabreichung einer intravenösen Einzelinjektion von $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon finden sich keine Unterschiede in der Eliminationskinetik zwischen jüngeren (Alter ca. 12 Wochen) und älteren (Alter ca. 36 Wochen) männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Abbildung 12).

Es zeigt sich, daß die biologische Halbwertszeit, die apparente Eliminationskonstante, das fiktive Verteilungsvolumen, die Plasmaclearance und die Plasmaproteinbindung in beiden Altersgruppen praktisch identisch sind (Tabelle 4). Auch die auf freiem, nicht gebundenem Phenprocoumon basierenden Parameter unterscheiden sich in beiden Altersgruppen nicht (Tabelle 4).

Verteilung zwischen Plasma und Leber

Dem körperlichen Wachstum im untersuchten Entwicklungszeitraum der Ratten kann die Leber nicht im gleichen Maße folgen: Es kommt zu einer Abnahme des relativen Lebergewichtes (in Prozent des Körpergewichtes, Tabelle 5). Der Anteil der Dosis, der sich 54 Stunden nach der Injektion in der Leber

befindet, ist demzufolge bei älteren Ratten höher. Deshalb steigt bei identischen Plasmaspiegeln auch das Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis in älteren Ratten signifikant an (Tabelle 5). Die Bindung an das Lebergewebe ist bei älteren Ratten stärker. Die im 1 : 4 verdünnten Leberhomogenat gemessenen Bindungswerte unterscheiden sich signifikant, die errechneten Werte haben den gleichen Trend, ohne daß sich dieser Befund statistisch sichern läßt (Tabelle 5). Die gemessenen und berechneten freien Konzentrationen in der Leber sind in beiden Altersgruppen gleich (Tabelle 5).

Gerinnungshemmende Wirksamkeit

Die gerinnungshemmende Wirkung einer intravenös verabreichten Einzeldosis von $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon in sechs jüngeren und sechs älteren Ratten ist als Mittelwertskurve in Abbildung 13 dargestellt. Die eingeschlossenen Flächen der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) vs. Zeit-Kurven dienen als Maß der gerinnungshemmenden Wirksamkeit pro Dosis. Diese Flächen sind in älteren Ratten signifikant größer als in jüngeren Tieren (3419 ± 442 % der Norm $\cdot$ Stunden bzw. 2617 ± 212 % der Norm $\cdot$ Stunden ; $p < 0,005$).

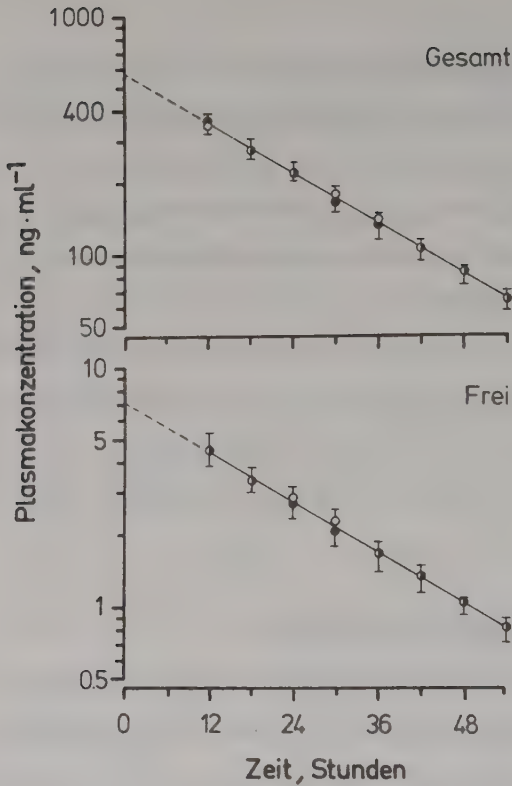


Abb. 12: Zeitverlauf der Plasmakonzentrationen von freiem und Gesamtphenprocoumon in jungen (●) und älteren männlichen Ratten (○) nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Anzahl der Tiere $n = 6$).

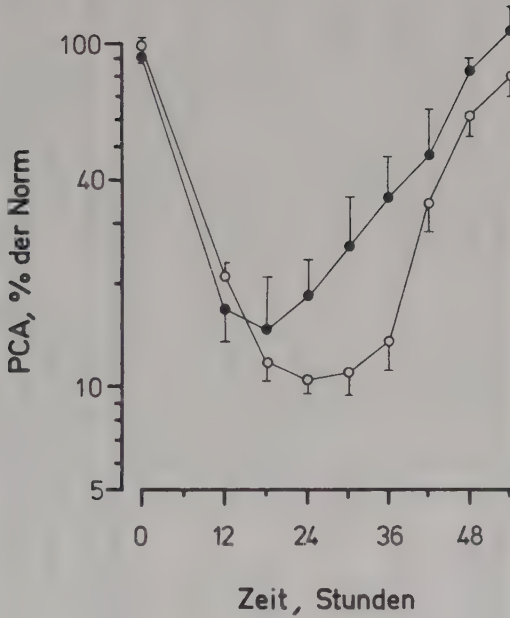


Abb. 13: Zeitverlauf der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) im Plasma von jungen (●) und älteren männlichen Ratten (○) nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon (Mittelwert $\pm$ Mittlerer Fehler des Mittelwertes; Anzahl der Tiere $n = 6$).

Tabelle 4: Einfluß des Lebensalters auf die Eliminationskinetik von Phenprocoumon in männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 6)

Parameter	Jüngere Ratten	Ältere Ratten	t-Test ^a
Parameter basierend auf Gesamtphenprocoumon			
Biologische Halbwertszeit (Stunden)	17,5 $\pm$ 1,8	17,6 $\pm$ 1,3	NS
Fiktives Verteilungsvolumen (ml $\cdot$ kg ⁻¹)	619 $\pm$ 105	616 $\pm$ 66	NS
Plasmaclearance (ml $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ Stunde ⁻¹)	24,5 $\pm$ 2,5	24,5 $\pm$ 1,0	NS
Apparente Eliminationskonstante (Stunde ⁻¹)	0,0400 $\pm$ 0,0045	0,0395 $\pm$ 0,0291	NS
Freier Anteil im Plasma (% der Gesamtkonz.)	1,24 $\pm$ 0,07	1,27 $\pm$ 0,11	NS
Parameter basierend auf freiem Phenprocoumon			
Fiktives Verteilungsvolumen (ml $\cdot$ kg ⁻¹)	50331 $\pm$ 9201	50188 $\pm$ 9645	NS
Intrinsische Clearance (ml $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ Stunde ⁻¹)	1988 $\pm$ 252	1951 $\pm$ 241	NS
Intrinsische Eliminationskonstante (Stunde ⁻¹)	0,1576 $\pm$ 0,0144	0,1548 $\pm$ 0,0154	NS

^a Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Ratten

Tabelle 5: Einfluß des Lebensalters auf die Verteilung von Phenprocoumon zwischen Plasma und Leber in männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 6)

Parameter	Jüngere Ratten	Ältere Ratten	t-Test ^a
Lebergewicht (% des Körpergewichtes)	2,96 $\pm$ 0,10	2,35 $\pm$ 0,12	p < 0,001
Leber/Plasma-Konzentrations- verhältnis	5,92 $\pm$ 0,60	6,68 $\pm$ 0,45	p < 0,05
Dosisanteil in der Leber	0,257 $\pm$ 0,049	0,252 $\pm$ 0,039	NS
Freier Anteil in der Leber, gemessen ^b (% der Gesamtkonz.)	6,33 $\pm$ 0,89	4,80 $\pm$ 0,87	p < 0,05
Freie Konz. in der Leber, gemessen ^b (ng $\cdot$ g ⁻¹)	24,1 $\pm$ 5,0	21,4 $\pm$ 4,6	NS
Freier Anteil in der Leber, errechnet ^c (% der Gesamtkonz.)	0,148 $\pm$ 0,019	0,134 $\pm$ 0,015	NS
Freie Konz. in der Leber, errechnet ^c (ng $\cdot$ g ⁻¹)	0,55 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,05	NS

^a Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Ratten

^b ermittelt mittels Gleichgewichtsdialyse von Leberhomogenat (1 : 4)

^c ermittelt nach Levy et al., 1978

2.2. DER EINFLUSS VON PHENPROCOUNON AUF DEN VITAMIN K₁- EPOXID-ZYKLUS IN JUNGEN UND ALTEN MÄNNLICHEN RATTEN

Zur Untersuchung der Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel wurde 10 jungen und 11 älteren Inzucht-Lewis-Ratten eine intravenöse Einzeldosis von $47 \mu\text{Ci} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($\Delta 64,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Tritium-markiertes Vitamin K₁ verabreicht. Die Ratten erhielten 30 Minuten vor der Vitamin K₁-Injektion intravenöse Phenprocoumondosen von 0,02 bis 3,00 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ bzw. physiologische Kochsalzlösung.

Sechs Stunden nach der Injektion von Vitamin K₁ wurden die Tiere getötet und in den entnommenen Lebern Vitamin K₁, Vitamin K₁-epoxid, die Gesamtradioaktivität sowie Phenprocoumon bestimmt. In Tabelle 6 ist der Gehalt der Lebern an Gesamtradioaktivität aufgelistet. Es zeigt sich, daß der Anteil der Dosis, der sich nach sechs Stunden in der Leber der jüngeren Tiere befindet, um ca. 20 % niedriger als bei den älteren Ratten ist. Dieser Befund beruht zum Teil auf dem um ca. 20 % geringeren relativen Lebergewicht der älteren Ratten (das mittlere relative Lebergewicht der jungen Ratten war $2,98 \pm 0,17 \%$, das der älteren $2,34 \pm 0,11 \%$ des Körpergewichtes). Da Vitamin K₁ bezogen auf das Körpergewicht dosiert wurde, erhielten die älteren Ratten somit eine höhere Dosis bezogen auf g Lebergewicht. Die Art der Vorbehandlung mit Phenprocoumon hatte in beiden Altersgruppen keinen Einfluß auf den Gehalt der Lebern an Ge-

samtradioaktivität (Tabelle 6).

Während sich der relative Vitamin K_1 -Gehalt der Lebern der Kontrolltiere und der mit der niedrigsten Phenprocoumondosis behandelten Tiere nicht unterscheidet, kommt es bei weiterer Erhöhung der Phenprocoumondosis zu einem beständigen Abfall der Vitamin K_1 -Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg des Vitamin K_1 -2,3-epoxides (Abbildung 14, Tabelle 6). Dabei zeigt sich, daß der relative Vitamin K_1 -Gehalt der Leber der älteren Ratte -im Vergleich zum jeweils gleichbehandelten jüngeren Tier- immer niedriger ist, während der relative Vitamin K_1 -epoxid-Gehalt immer eindeutig höher ist (Tabelle 6). Auch führen bei den älteren Ratten bereits niedrigere Phenprocoumondosen zu einer deutlichen Bildung von Vitamin K_1 -epoxid (Abbildung 14, Tabelle 6).

Der Anteil der Metabolite (Differenz aus Gesamtradioaktivität und der Radioaktivität von Vitamin K_1 und Vitamin K_1 -epoxid) nimmt ebenfalls mit steigender Phenprocoumondosis zu. Es bestehen jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abbildung 15, Tabelle 6).

Trägt man als quantitatives Maß für die Hemmung der Vitamin K_1 -epoxid-Reduktase das Verhältnis Vitamin K_1 -epoxid/Vitamin K_1 auf der Ordinate gegen die Phenprocoumondosis (Abbildung 16a) bzw. gegen die in der Leber gemessene Phenprocoumonkonzentration (Abbildung 16b) auf der Abszisse auf, erhält man typische Dosis- oder Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, die sich in erster Linie in der

maximal erreichbaren Wirkung (Verhältnis Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁) unterscheiden. Sie ist in älteren Ratten etwa 1,6-fach größer (Abbildungen 16a und 16b).

Aus den Kurven lassen sich ED₅₀ (i.e. die Dosis, bei der die halbmaximale Wirkung eintritt) und EC₅₀ (i.e. die gemessene Phenprocoumonkonzentration in der Leber, bei der die halbmaximale Wirkung eintritt) ermitteln.

Der ED₅₀-Wert ist mit 0,165 mg · kg⁻¹ gegenüber 0,200 mg · kg⁻¹ für ältere Ratten etwas niedriger, was auf eine geringe Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für ältere Ratten hinweist (Abbildung 16a).

Eine Linksverschiebung war in der Leberkonzentrations-Wirkungs-Beziehung jedoch nicht nachweisbar. Hier wurden mit 0,175 µg · kg⁻¹ und 0,170 µg · kg⁻¹ für ältere und jüngere Ratten praktisch identische EC₅₀-Werte erhalten (Abbildung 16b).

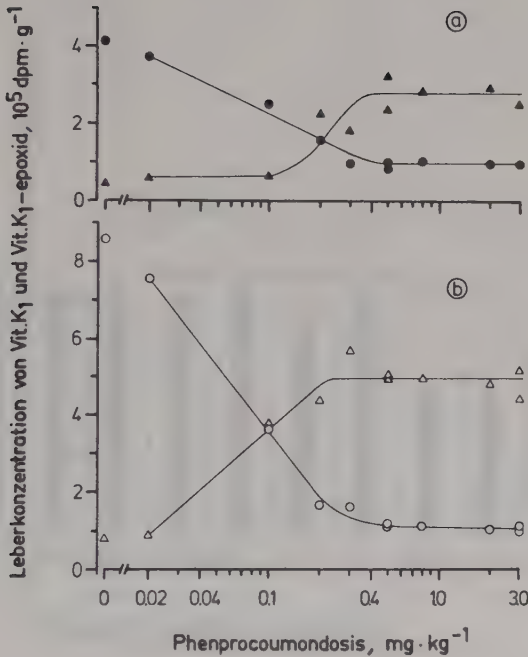


Abb. 14: Einfluß einer Vorbehandlung mit steigenden Dosen von Phenprocoumon auf die Leberkonzentrationen von Vitamin K₁ (○) und Vitamin K₁-2,3-epoxid (Δ) in jungen (Teil a) und älteren männlichen Ratten (Teil b). Die Werte wurden sechs Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von $64,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Vitamin K₁ ermittelt. Phenprocoumon wurde 30 Minuten vor der Vitamin K₁-Dosis intravenös verabreicht.

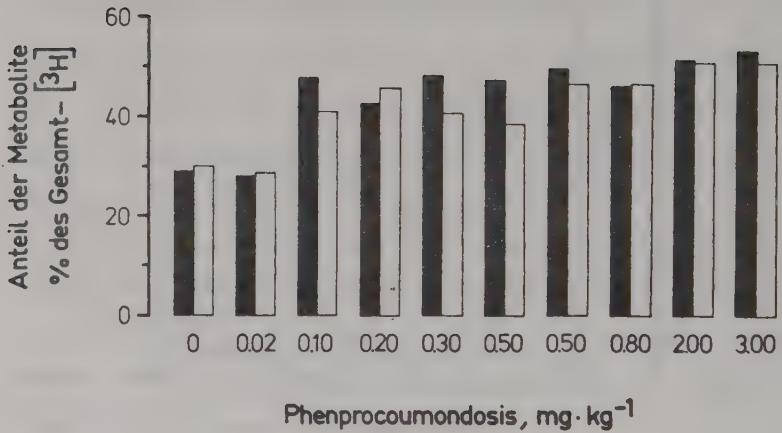


Abb. 15: Einfluß einer Vorbehandlung mit steigenden Dosen von Phenprocoumon auf den Anteil polarer Metabolite an der Gesamtradioaktivität in der Leber von jungen (■) und älteren männlichen Ratten (□). Die Werte wurden sechs Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von $64,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Vitamin K₁ ermittelt. Phenprocoumon wurde 30 Minuten vor der Vitamin K₁-Dosis intravenös verabreicht. Jede Säule repräsentiert ein Einzeltier.

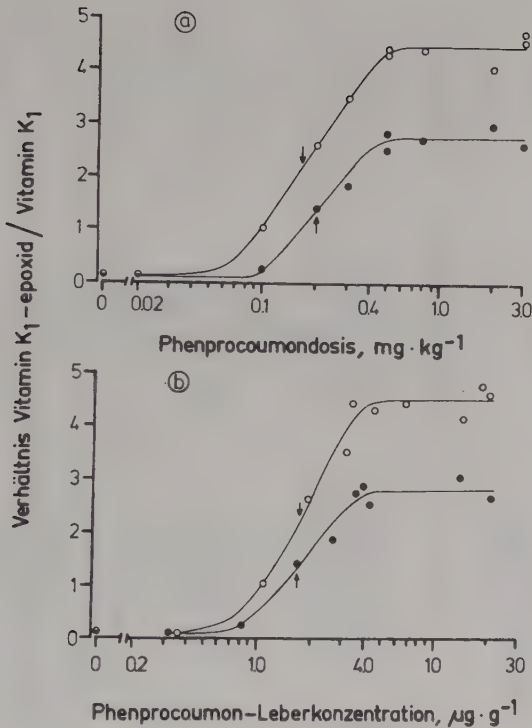


Abb. 16: Einfluß einer Vorbehandlung mit steigenden Dosen von Phenprocoumon auf das Verhältnis Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁ in der Leber von jüngeren (●) und älteren männlichen Ratten (○). Die Werte wurden sechs Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von $64,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Vitamin K₁ ermittelt. Phenprocoumon wurde 30 Minuten vor der Vitamin K₁-Injektion intravenös verabreicht. Die Pfeile an der Dosis-Wirkungs- (Teil a) und der Leberkonzentrations-Wirkungs-Beziehung (Teil b) markieren den ED₅₀- bzw. den EC₅₀-Wert.

Tabelle 6a: Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel in der Leber von jüngeren und älteren männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (jede Phenprocoumon-dosis wurde je einem Einzeltier verabreicht)

Jüngere Ratten

Dosis Phenprocoumon mg · kg ⁻¹	Gesamtradio- aktivität	Vitamin K ₁ % der Gesamt- radioaktivität	Vitamin K ₁ -epoxid % der Gesamt- radioaktivität	Metabolite % der Gesamt- radioaktivität
0,00	20,59	62,36	8,49	29,15
0,02	15,98	61,63	10,37	28,00
0,10	19,18	41,54	10,98	47,48
0,20	19,00	23,56	33,83	42,61
0,30	18,92	15,20	28,49	56,31
0,50	17,93	13,66	39,32	47,01
0,50	25,07	12,86	32,31	54,83
0,80	21,94	14,36	39,57	46,07
2,00	25,14	12,04	36,67	51,29
3,00	23,28	12,70	34,37	52,93

Tabelle 6b:

Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel in der Leber von jüngeren und älteren männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (jede Phenprocoumondosis wurde je einem Einzeltier verabreicht)

Ältere Ratten

Dosis Phenprocoumon	Gesamtradio- aktivität	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁ -epoxid	Metabolite
mg · kg ⁻¹	% der Dosis in der Leber	% der Gesamt- radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität
0,00	29,69	63,65	6,34	30,01
0,02	28,03	63,69	7,64	28,67
0,10	28,52	28,67	30,21	41,11
0,20	25,25	15,03	39,52	45,45
0,30	26,97	13,25	46,52	40,23
0,50	23,04	11,38	50,65	37,97
0,50	26,61	10,02	43,47	46,51
0,80	24,64	9,88	43,69	46,43
2,00	28,63	9,44	40,07	50,49
3,00	31,21	9,31	44,02	46,67
3,00	28,59	8,84	40,75	50,41

3. DER EINFLUSS DES GESCHLECHTES AUF PHARMAKOKINETIK UND GERINNUNGSHEMMENDE WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON

3.1. PHARMAKOKINETIK UND WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON IN MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN RATTEN

Eliminationskinetik

Männliche und weibliche Inzucht-Lewis-Ratten zeigen in den Parametern der Eliminationskinetik nach Applikation einer intravenösen Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon ausgeprägte Unterschiede.

Die biologische Halbwertszeit von Phenprocoumon ist bei weiblichen Ratten im Mittel $26,0 \pm 3,3$ Stunden und bei männlichen Tieren $17,5 \pm 1,8$ Stunden (Abbildung 17, Tabelle 7). Der freie Anteil von Phenprocoumon im Plasma ist bei männlichen Tieren um etwa ein Drittel größer. Weibliche Ratten haben ein deutlich niedrigeres fiktives Verteilungsvolumen und, im Vergleich zu den männlichen Ratten, eine stark reduzierte Plasmaclearance (Tabelle 7). Auch in den Parametern, die auf freiem, nicht gebundenem Phenprocoumon beruhen, finden sich signifikante Unterschiede.

Das fiktive Verteilungsvolumen des freien Arzneistoffes ist bei weiblichen Ratten kleiner (Tabelle 7). Die intrinsische Clearance und die intrinsische Eliminationskonstante, die beide Kenngrößen der metabolischen Stoffwechselleistung der Leber sind, sind bei männlichen Lewis-Ratten fast zwei- bzw. dreimal größer als bei weiblichen Tieren

des gleichen Stammes (Tabelle 7).

Verteilung zwischen Plasma und Leber

Bei gleichem relativem Lebergewicht und gleichem Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis ist der Anteil der Phenprocoumondosis in der Leber weiblicher Ratten doppelt so groß wie bei den männlichen Tieren (Tabelle 8). Die Bindung an das Lebergewebe ist - wenn man die gemessenen Werte zugrunde legt - bei weiblichen Ratten stärker (Tabelle 8). Die errechneten Werte haben die gleiche Tendenz, sind jedoch zwischen männlichen und weiblichen Ratten statistisch nicht unterschiedlich.

Sowohl die errechneten als auch die gemessenen freien, nicht gebundenen Konzentrationen von Phenprocoumon sind in der Leber weiblicher Tiere dreimal höher als in der männlicher Ratten (Tabelle 8).

Gerinnungshemmende Wirksamkeit

Die Gerinnungszeiten im Plasma unbehandelter weiblicher Ratten sind beträchtlich kürzer als die der männlichen Tiere ($16,4 \pm 0,5$ Sekunden gegenüber $21,7 \pm 1,0$ Sekunden). Für die Ermittlung der Prothrombinkomplexaktivität müssen daher Eichkurven aus Mischplasmen jeweils weiblicher oder männlicher Ratten zugrunde gelegt werden.

Nach Verabreichung einer intravenösen Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon fällt die Prothrombinkomplex-

aktivität bei weiblichen Ratten etwas langsamer als bei männlichen Tieren ab (Abbildung 18). Die Wirkungsdauer ist dagegen in weiblichen Ratten länger (Abbildung 18). Die eingeschlossenen Flächen der Wirkungs-Zeit-Kurven (PCA vs. Zeit), die ein quantitatives Maß für die gerinnungshemmende Wirkung einer Einzeldosis darstellen, sind in weiblichen Ratten signifikant größer (Tabelle 9).

Die Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung ist bei weiblichen Ratten nach rechts - also zu höheren Phenprocoumon-plasmakonzentrationen - verschoben (Tabelle 9). Auch die sogenannte halbeffektive Plasmakonzentration (C_p 50 %) von freiem, nicht gebundenem Phenprocoumon ist bei weiblichen Ratten doppelt so hoch wie bei männlichen Tieren (Tabelle 9).

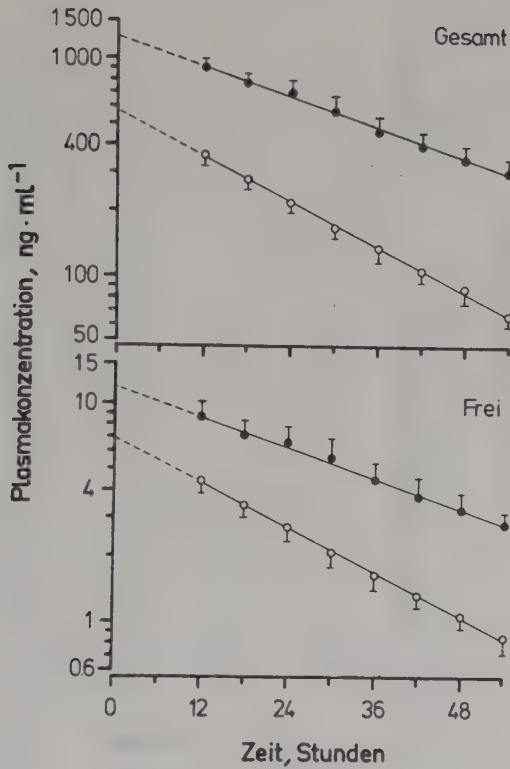


Abb. 17: Zeitverlauf der Plasmakonzentrationen von freiem und Gesamtphenprocoumon in männlichen (o) und weiblichen Ratten (•) nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Anzahl der Tiere $n = 6$).

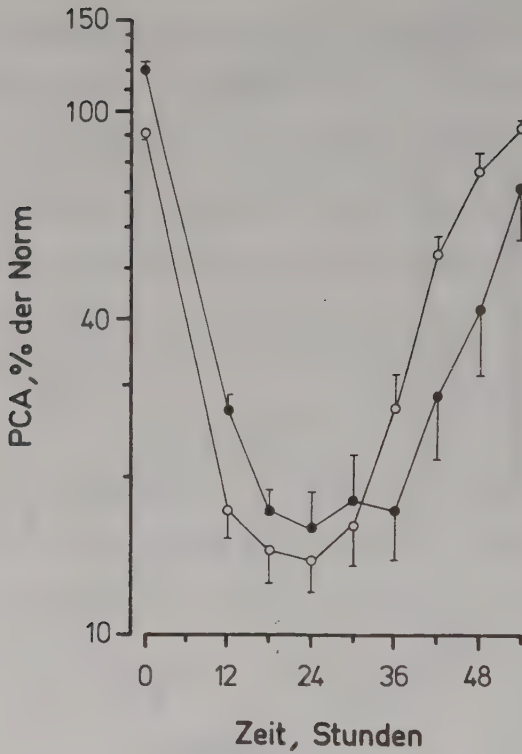


Abb. 18: Zeitverlauf der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) im Plasma von männlichen (o) und weiblichen Ratten (●) nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon. (Mittelwert $\pm$ Mittlerer Fehler des Mittelwertes; Anzahl der Tiere $n = 6$).

Tabelle 7: Eliminationskinetik von Phenprocoumon in weiblichen und männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 6)

Parameter	Weibliche Ratten	Männliche Ratten	t-Test ^a
Parameter basierend auf Gesamtphenprocoumon			
Biologische Halbwertszeit (Stunden)	26,0 $\pm$ 3,3	17,5 $\pm$ 1,8	p < 0,001
Fiktives Verteilungsvolumen (ml $\cdot$ kg ⁻¹)	282 $\pm$ 48	619 $\pm$ 105	p < 0,001
Plasmaclearance (ml $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ Stunde ⁻¹)	7,56 $\pm$ 1,18	24,46 $\pm$ 2,52	p < 0,001
Apparente Eliminationskonstante (Stunde ⁻¹)	0,0267 $\pm$ 0,0040	0,0400 $\pm$ 0,0045	p < 0,001
Freier Anteil im Plasma (% der Gesamtkonz.)	0,94 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,07	p < 0,001
Parameter basierend auf freiem Phenprocoumon			
Fiktives Verteilungsvolumen (ml $\cdot$ kg ⁻¹)	30282 $\pm$ 6441	50331 $\pm$ 9201	p < 0,005
Intrinsische Clearance (ml $\cdot$ kg ⁻¹ $\cdot$ Stunde ⁻¹)	805 $\pm$ 131	1988 $\pm$ 252	p < 0,001
Intrinsische Eliminationskonstante (Stunde ⁻¹)	0,0546 $\pm$ 0,0085	0,1576 $\pm$ 0,0144	p < 0,001

^a Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Ratten

Tabelle 8: Verteilung von Phenprocoumon zwischen Plasma und Leber in weiblichen und männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 6)

Parameter	Weibliche Ratten	Männliche Ratten	t-Test ^a
Lebergewicht (% des Körpergewichtes)	2,85 $\pm$ 0,27	2,69 $\pm$ 0,10	NS
Leber/Plasma-Konzentrations- verhältnis	5,00 $\pm$ 1,00	5,92 $\pm$ 0,60	NS
Dosisanteil in der Leber	0,511 $\pm$ 0,134	0,257 $\pm$ 0,049	p < 0,005
Freier Anteil in der Leber, gemessen ^b (% der Gesamtkonz.)	4,82 $\pm$ 0,61	6,33 $\pm$ 0,89	p < 0,01
Freier Anteil in der Leber, errechnet ^c (% der Gesamtkonz.)	0,135 $\pm$ 0,018	0,148 $\pm$ 0,019	NS
Freie Konz. in der Leber, errechnet ^c (ng $\cdot$ g ⁻¹)	1,86 $\pm$ 0,23	0,56 $\pm$ 0,07	p < 0,001
Freier Anteil im Körpergewebe ^d (% der Gesamtkonz.)	2,69 $\pm$ 0,67	1,46 $\pm$ 0,32	p < 0,005

^a Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Ratten

^b ermittelt mittels Gleichgewichtsdialyse von Leberhomogenat (1 : 4)

^c ermittelt nach Levy et al., 1978

^d ermittelt nach Gibaldi und McNamara, 1977

Tabelle 9: Gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon in weiblichen und männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 6)

Parameter	Weibliche Ratten	Männliche Ratten	t-Test ^a
C _p 50 %, Gesamtkonzentration (ng · ml ⁻¹)	382 $\pm$ 107	162 $\pm$ 25	p < 0,005
C _p 50 %, freie Konzentration (ng · ml ⁻¹)	3,54 $\pm$ 0,79	1,75 $\pm$ 0,56	p < 0,005
Fläche über der PCA vs. Zeit-Kurve (% der Norm · Stunden)	4589 $\pm$ 1004	2617 $\pm$ 212	p < 0,005

^a Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Ratten

3.2. DER EINFLUSS VON PHENPROCOUMON AUF DEN VITAMIN K₁-EPOXID-ZYKLUS IN MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN RATTEN

Zur Untersuchung einer möglichen geschlechtsspezifischen Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus in der Leber wurden je sechs männliche und sechs weibliche Inzucht-Lewis-Ratten mit intraperitoneal verabreichtem, nichtmarkiertem Phenprocoumon in Dosen von 0,02 bis 1,0 mg · kg⁻¹ bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt. Eine halbe Stunde später wurde den Ratten eine Einzeldosis von 15,5 µCi · kg⁻¹ ($\cong$ 21,3 µg · kg⁻¹) Tritium-markiertem Vitamin K₁ intravenös injiziert.

Sechs Stunden nach der Vitamin K₁-Injektion befanden sich noch ca. 25 % der verabreichten Radioaktivität in den Lebern der weiblichen Tiere; die männlichen Rattenlebern enthielten mit ca. 22 % einen etwas geringeren Anteil der Dosis (Tabelle 10).

Erwartungsgemäß kommt es sowohl in den Lebern der weiblichen als auch der männlichen Tiere mit ansteigenden Dosen von Phenprocoumon zu einem Abfall der Vitamin K₁-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg des Vitamin K₁-2,3-epoxid-Gehaltes (Abbildung 19, Tabelle 10). Der Abfall bzw. Anstieg von Vitamin K₁ oder Vitamin K₁-epoxid verläuft in beiden Kollektiven vergleichbar (Abbildung 19).

Als quantitatives Maß der Hemmung der Vitamin K₁-epoxid-Reduktase dient das Verhältnis von gebildetem Vitamin K₁-

epoxid zu Vitamin K₁ in der Leber. Zwischen weiblichen und männlichen Ratten ergeben sich jedoch bei gleicher Dosis und gleicher gemessener Phenprocoumonkonzentration in der Leber keine wesentlichen Unterschiede im Verhältnis Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁ (Abbildung 20).

Die Menge an Metaboliten, die sich sechs Stunden nach der Vitamin K₁-Injektion in der Leber befindet, nimmt mit steigender Phenprocoumondosis in beiden Tiergruppen zu (Abbildung 21, Tabelle 10), wobei der Anteil der polaren Metabolite in weiblichen Ratten etwas kleiner als in männlichen Tieren ist (Abbildung 21, Tabelle 10).

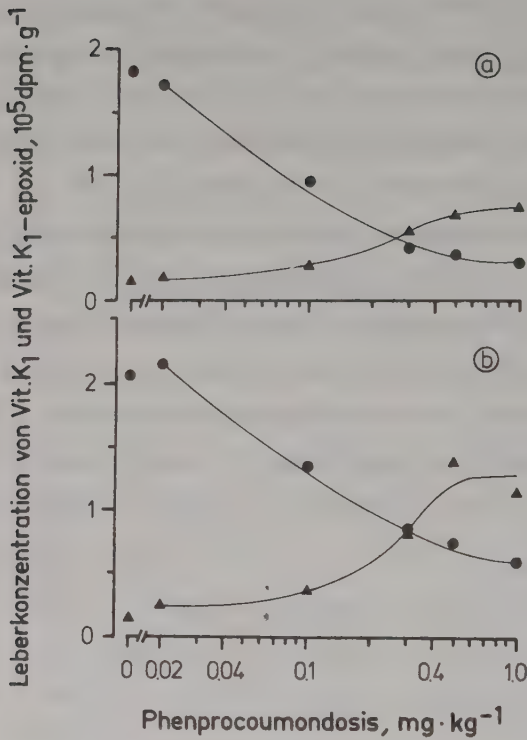


Abb. 19: Einfluß einer Vorbehandlung mit steigenden Dosen von Phenprocoumon auf die Leberkonzentrationen von Vitamin K₁ (●) und Vitamin K₁-2,3-epoxid (▲) in männlichen (Teil a) und weiblichen Ratten (Teil b). Die Werte wurden sechs Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von 21,3 µg · kg⁻¹ Vitamin K₁ ermittelt. Phenprocoumon wurde 30 Minuten vor der Vitamin K₁-Dosis intraperitoneal verabreicht.

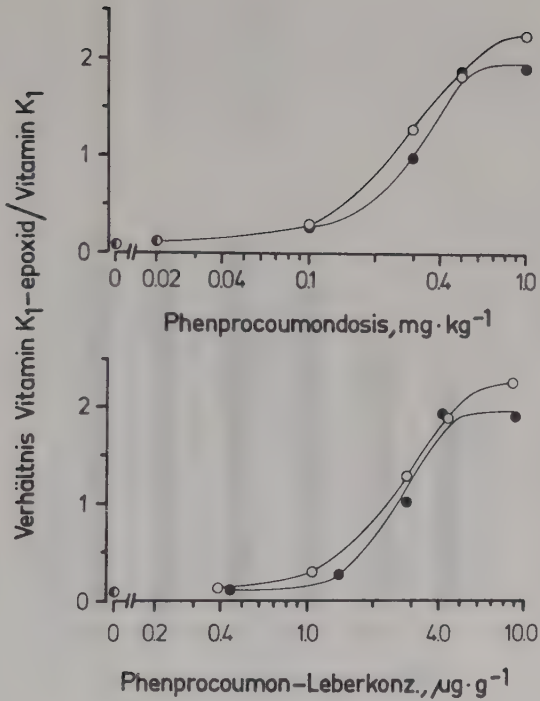


Abb. 20: Einfluß einer Vorbehandlung mit steigenden Dosen von Phenprocoumon auf das Verhältnis Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁ in der Leber von männlichen (o) und weiblichen Ratten (●). Die Werte wurden sechs Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von 21,3 µg · kg⁻¹ Vitamin K₁ ermittelt. Phenprocoumon wurde 30 Minuten vor der Vitamin K₁-Injektion intraperitoneal verabreicht.

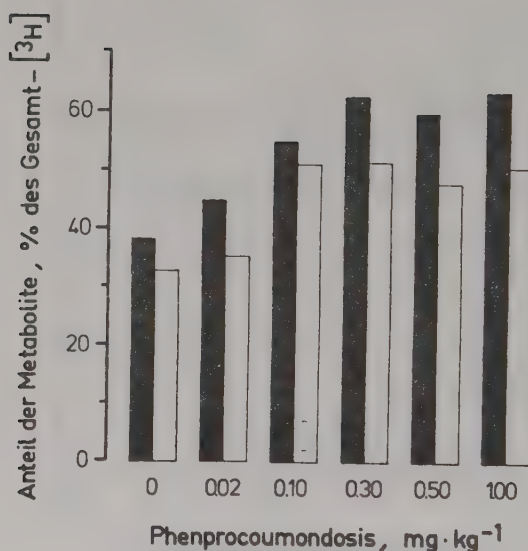


Abb. 21: Einfluß einer Vorbehandlung mit steigenden Dosen von Phenprocoumon auf den Anteil polarer Metabolite an der Gesamtradioaktivität in der Leber von männlichen (□) und weiblichen Ratten (■). Die Werte wurden sechs Stunden nach der intravenösen Injektion einer Einzeldosis von $21,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Vitamin K_1 ermittelt. Phenprocoumon wurde 30 Minuten vor der Vitamin K_1 -Dosis intraperitoneal verabreicht. Jede Säule repräsentiert ein Einzeltier.

Tabelle 10a: Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel in der Leber von weiblichen und männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (jede Phenprocoumondosis wurde je einem Einzeltier verabreicht)

Männliche Ratten

Dosis Phenprocoumon mg · kg ⁻¹	Gesamtradio- aktivität	Vitamin K ₁ radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität	Vitamin K ₁ -epoxid radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität	Metabolite
0,00	25,53	56,64		5,29		38,07
0,02	25,12	49,56		5,41		45,02
0,10	21,11	34,68		10,61		54,71
0,30	20,11	16,31		21,38		62,31
0,50	20,11	14,17		26,26		59,57
1,00	21,24	11,22		25,57		63,21

Tabelle 10b: Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel in der Leber von weiblichen und männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (jede Phenprocoumondosis wurde je einem Einzeltier verabreicht)

Weibliche Ratten

Dosis Phenprocoumon mg · kg ⁻¹	Gesamtradio- aktivität	Vitamin K ₁		Vitamin K ₁ -epoxid		Metabolite
	% der Dosis in der Leber	% der Gesamt- radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität	% der Gesamt- radioaktivität	
0,00	26,13	63,07		4,48		32,45
0,02	25,54	58,10		6,77		35,13
0,10	24,01	38,57		10,58		50,85
0,30	26,64	24,36		24,62		51,01
0,50	26,45	17,92		34,56		47,52
1,00	26,40	17,12		32,39		50,49

III. DISKUSSION

DER EINFLUSS DER SERUMPROTEINBINDUNG AUF PHARMAKOKINETIK UND GERINNUNGSCHEMMENDE WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUNON

Die Synthese des Prothrombins und der anderen sogenannten Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren VII, IX und X findet in der Leber statt. Die Leber ist damit der Wirkort der oralen Antikoagulantien vom Cumarin-Typ, zu denen auch Phenprocoumon zählt. Da Phenprocoumon nach Biotransformation in der Leber (Hydroxylierung zu 4'-, 6'-, 7- und 8-Hydroxyphenprocoumon (Haddock et al., 1975) ausgeschieden wird, ist die Leber zugleich auch das Eliminationsorgan für Phenprocoumon. Sowohl die gerinnungshemmende Wirkung als auch die Elimination sollten daher entscheidend von der Aufnahme von Phenprocoumon aus dem Blut in die Leber abhängig sein. Es gibt bisher keine Hinweise für eine kapazitätsbegrenzte Biotransformation von Phenprocoumon. Die Aufnahme von Phenprocoumon in die Leber ist aufgrund der niedrigen Extraktionsrate nicht durch den Leberblutfluß limitiert, sondern infolge der starken Bindung an Serumproteine vom Angebot an ungebundenem Arzneistoff abhängig (Wilkinson und Shand, 1975). Daher sollte die Eliminationskinetik durch das Ausmaß der Serumproteinbindung beeinflusst werden (Rowland und Matin, 1973; Levy und Yacobi, 1974). Es ist bisher aber nicht geklärt, ob und in welchem Ausmaß eine Änderung der Serumproteinbindung

von oralen Antikoagulantien auch mit einer entsprechenden Änderung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit einhergeht. Diese Frage sollte mit zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen näher studiert werden.

Zum einen wurde die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik von Phenprocoumon in Ratten mit interindividuell unterschiedlicher Serumproteinbindung für dieses Pharmakon untersucht. Zu diesem Zweck wurde in einem großen Kollektiv von 150 Auszucht-Sprague-Dawley-Ratten die Serumproteinbindung von Phenprocoumon gemessen. Es fanden sich nahezu vierfache Unterschiede im Ausmaß des freien Anteiles im Serum (Abbildung 2). Es konnte gezeigt werden, daß die intrinsische Clearance, die ein Maß für die Aktivität der metabolisierenden Enzyme darstellt, für Phenprocoumon in diesen Ratten nicht wesentlich verschieden ist ($Cl_{intr} = 1527 \pm 522 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Stunde}^{-1}$). Die Ursache der unterschiedlichen Serumproteinbindung dieser Ratten ist weder mit Unterschieden im Gesamtprotein- noch im Albumingehalt der Seren zu erklären. Offenbar sind es vielmehr genetisch bedingte Unterschiede in der Bindungskapazität des Serums für Phenprocoumon, was auch für Nortriptylin (Alexanderson und Borga, 1972) und für Thyroxin (Nicoloff et al., 1964; Carfagana et al., 1972; Refetoff et al., 1972) bereits gezeigt werden konnte. Aus diesem Kollektiv wurden dann 25 Ratten mit unterschiedlicher Serumproteinbindung von Phenprocoumon selektiert und näher untersucht.

Zum anderen wurde die Serumproteinbindung von Phenprocoumon durch die gleichzeitige Behandlung der Tiere mit Tolbutamid modifiziert. Dieses Pharmakon verdrängt bei *in vitro*-Untersuchungen Phenprocoumon aus dessen Serumproteinbindung (Abbildung 9), ohne - wie sich im folgenden herausstellte - dessen intrinsische metabolische Clearance zu beeinflussen (Tabelle 1). Für diese Untersuchungen wurden Inzucht-Lewis-Ratten verwendet, da diese sich hinsichtlich der Pharmakokinetik und der Wirksamkeit von Phenprocoumon homogen verhalten.

In den untersuchten 25 Sprague-Dawley-Ratten waren nahezu dreifache Unterschiede im freien Anteil von Phenprocoumon im Serum nachweisbar. Es ergab sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem freien Anteil im Serum und der apparenten Eliminationskonstante k_{app} ($r = 0,77$, $p < 0,001$; Abbildung 3). Eine solche Beziehung fand sich auch zwischen dem freien Anteil und der Plasmaclearance von Phenprocoumon ($r = 0,55$, $p < 0,01$; Abbildung 4). Nach Yacobi und Levy (1975) besteht zwischen der Plasmaclearance (Cl) und dem freien Anteil im Serum (f_s) die Beziehung

$$Cl = Cl_{intr} \cdot f_s$$

wobei Cl_{intr} , die intrinsische Clearance, ein Maß für die Aktivität des metabolisierenden Enzymsystems ist. Danach muß eine graphische Darstellung, in der die Plasmaclearance gegen den freien Anteil im Serum aufgetragen wird, eine lineare Beziehung ergeben, die durch den Nullpunkt des

Koordinatensystems geht und deren Steigung die intrinsische Clearance repräsentiert. Diese Beziehung zwischen Plasmaclearance (Cl) und dem freien Anteil (f_s) konnte in den untersuchten Ratten nachgewiesen werden (Abbildung 4). Daraus folgt, daß für Phenprocoumon die Plasmaclearance eine Funktion des freien Anteiles im Serum ist, während die intrinsische Clearance demgegenüber in allen Tieren nicht wesentlich verschieden sein dürfte.

Mit steigendem freiem Anteil im Serum kommt es zu einer linearen Zunahme des Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnisses (Abbildung 5). Dieser Befund ist zu erwarten, wenn sich die Tiere überwiegend im freien Anteil im Serum unterscheiden, ohne daß sich der freie Anteil im Lebergewebe gleichsinnig ändert. Das war in den untersuchten Ratten der Fall. Es bestanden zwar etwa zweifache Unterschiede sowohl im gemessenen als auch im errechneten freien Anteil im Lebergewebe, diese zeigten jedoch keine Korrelation mit dem freien Anteil im Serum ($r = 0,07$ bzw. $r = 0,27$, $p > 0,05$). Im Gegensatz dazu nimmt für Warfarin das Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis nicht mit steigendem freiem Anteil im Serum zu (Yacobi und Levy, 1975; Levy et al., 1978), weil sich hier die Bindung an das Lebergewebe im gleichen Sinne wie die Serumproteinbindung ändert (Yacobi und Levy, 1975; Levy et al., 1978). Die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens ist bis jetzt nicht bekannt. Für Warfarin und Dicumarol wurde angenommen, daß im Organismus endogene Bindungsinhibitoren

vorhanden sind, die das Bindungsvermögen der Serumproteine und des Lebergewebes für diese Pharmaka in gleichem Maße beeinflussen (Levy et al., 1978). Da die Bindung von Phenprocoumon an Serumproteine ebenfalls unabhängig vom Gehalt an Gesamtprotein und an Albumin ist, könnten auch hier Bindungsinhibitoren für die interindividuellen Unterschiede in der Serumproteinbindung verantwortlich sein. Die Bindung von Phenprocoumon an Lebergewebe und Serumproteine sollte dann aber im Gegensatz zu Warfarin und Dicumarol unterschiedlich beeinflußt werden.

Der Befund, daß die in der Leber experimentell mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse bestimmten Bindungswerte sehr viel kleiner als die errechneten Werte sind, beruht wohl im wesentlichen auf der Verdünnung des Leberhomogenats (1 : 4), die für die Durchführung der Dialyseuntersuchungen erforderlich ist. Das Verhältnis gemessener zu errechneter Werte stimmt mit dem früherer Berichte überein (Schmidt und Jähnchen, 1979).

Das Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis und die freie Konzentration von Phenprocoumon in der Leber nehmen mit steigendem freien Anteil im Serum zu. Die Zunahme der freien Konzentration in der Leber ist in erster Linie auf eine Zunahme der Gesamtkonzentration zurückzuführen, da sich die Tiere in der Bindung von Phenprocoumon an das Lebergewebe nicht wesentlich unterscheiden. Die Zunahme der freien Konzentration und der Gesamtkonzentration von Phenprocoumon in der Leber mit steigendem freien Anteil im Serum führt

zu einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für Gesamtphenprocoumon im Plasma. Als Parameter zur Beurteilung der Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung dient die Plasmakonzentration von Phenprocoumon, die eine 50 %-ige Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes bewirkt (C_p 50 %). Werden diese C_p 50 %-Werte gegen die freien Anteile im Serum der Ratten dargestellt, ergibt sich eine signifikante, negative Korrelation (Abbildung 7), das heißt, je höher der freie Anteil von Phenprocoumon im Serum ist, um so niedriger ist die Gesamtplasmakonzentration, die für eine 50 %-ige Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes erforderlich ist. Wenn die hier beobachteten achtfachen Unterschiede in den C_p 50 %-Werten für Gesamtphenprocoumon nur auf der unterschiedlichen Serumproteinbindung beruhen, müßten die C_p 50 %-Werte für freies, nicht gebundenes Phenprocoumon identisch sein. Es sind jedoch auch hier Unterschiede um den Faktor 3,5 zu verzeichnen. Somit sollten teilweise auch pharmakodynamische Faktoren für die Unterschiede in der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Phenprocoumon verantwortlich sein. Ähnliche interindividuelle Unterschiede in der intrinsischen Wirksamkeit wurden auch für Warfarin gefunden (Yacobi und Levy, 1975).

Obwohl sich Ratten mit unterschiedlicher Serumproteinbindung von Phenprocoumon deutlich in ihrer Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung für Gesamtphenprocoumon unterscheiden, ist die gerinnungshemmende Wirksamkeit pro Dosis (als

deren Maß die Fläche über der Prothrombinkomplexaktivität (PCA) vs. Zeit - Kurve dient) in allen Tieren nicht wesentlich verschieden (Abbildung 8). Hier bestehen nur etwa 1,8-fache Unterschiede. Diese sind unabhängig vom Ausmaß der Serumproteinbindung ($r = 0,28$, $p > 0,05$) und somit auf die erwähnten interindividuellen Unterschiede in der intrinsischen Wirksamkeit zurückzuführen.

Offenbar nimmt mit dem Anstieg sowohl der freien als auch der Gesamtkonzentration in der Leber nicht nur die Wirksamkeit (gemessen an der Linksverschiebung der Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung für Gesamtphenprocoumon), sondern auch die Geschwindigkeit der Elimination von Phenprocoumon zu. Als Folge dieser beiden entgegengesetzten Prozesse bleibt eine Änderung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit pro Dosis aus.

Somit unterscheiden sich Ratten mit unterschiedlicher Serumproteinbindung von Phenprocoumon zwar hinsichtlich der Eliminationsgeschwindigkeit, des Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnisses und der Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung für Gesamtphenprocoumon, nicht aber in der Wirksamkeit pro verabreichter Dosis.

Aus den dargelegten Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß eine Verdrängung von Phenprocoumon aus der Serumproteinbindung durch andere Arzneimittel die gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon pro Dosis nicht beeinflusst,

wenn sich die Wechselwirkung auf die Veränderung des freien Anteiles im Serum beschränkt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Antidiabetikum Tolbutamid als Phenprocoumon verdrängendes Arzneimittel ausgewählt, da in Wechselwirkungsstudien mit Dicumarol Änderungen der Pharmakokinetik beobachtet wurden, die mit einer Verdrängung von Dicumarol aus der Serumproteinbindung durch Tolbutamid erklärbar sind (Lai und Levy, 1978). Zusätzlich wurde nach Verabreichung der gleichen Pharmaka an Menschen keine wesentliche Veränderung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit pro Dosis festgestellt (Jähnchen et al., 1976).

Bereits *in vitro* verdrängt Tolbutamid Phenprocoumon konzentrationsabhängig aus der Serumproteinbindung. Wird die zugesetzte Menge an Tolbutamid von $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf $400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ erhöht, kommt es zu einer nahezu sechsfachen Zunahme des freien Anteils von Phenprocoumon im Serum. Diese Verdrängung ist im Bereich von $0,03$ bis $0,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ unabhängig von der jeweiligen Phenprocoumonkonzentration (Abbildung 9).

Nach Verabreichung einer intravenösen Einzeldosis von Phenprocoumon ($0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) und kontinuierlicher oraler Verabreichung von Tolbutamid kommt es zu einer Zunahme der apparenten Eliminationskonstante, der Plasmaclearance und des fiktiven Verteilungsvolumens von Phenprocoumon (Abbildung 10, Tabelle 1). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Dicumarol beschrieben (Jähnchen et al., 1976; Lai und Levy, 1978).

Der Einfluß von Tolbutamid auf die Kinetik von freiem Phenprocoumon ist in Abbildung 10 dargestellt. Die initiale freie Konzentration ist in den mit Tolbutamid behandelten Ratten größer, fällt dann aber schneller als in Kontrolltieren ab. Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen, die für Phenytoin in hypoalbuminaemischen Patienten erhoben wurden (Gugler und Azarnoff, 1976). Auch hier traten im Vergleich zu normoalbuminaemischen Patienten höhere maximale und niedrigere minimale Plasmaspiegel von freiem, nicht gebundenem Arzneimittel auf. Computersimulationen, die eine proportionale Beziehung zwischen freiem Anteil im Serum und der Plasmaclearance voraussetzten, ergaben hinsichtlich der Kinetik der freien Substanz praktisch die gleichen Ergebnisse, wie sie in Abbildung 10 dargestellt sind (Levy, 1976). Danach führt eine Zunahme des freien Arzneimittelanteiles im Serum zu höheren maximalen und niedrigeren minimalen Plasmakonzentrationen der ungebundenen Substanz, während die durchschnittliche Steady-State-Konzentration des freien Arzneimittels (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve/Dosisintervall) nicht verändert wird.

Unter dem Einfluß von Tolbutamid und der daraus resultierenden Erhöhung des freien Anteiles von Phenprocoumon im Serum steigt das Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis fast auf das Doppelte an, da die Bindung von Phenprocoumon an das Lebergewebe nur geringfügig verändert wird (Tabelle 2).

Da nach Yacobi und Levy (1975) für Phenprocoumon und Warfarin die Plasmaclearance (Cl) eine Funktion des freien Anteiles

im Serum (f_s) und der intrinsischen Clearance (Cl_{intr}) ist

$$Cl = Cl_{intr} \cdot f_s$$

muß die Verdoppelung der Plasmaclearance praktisch der Verdoppelung des freien Anteiles von Phenprocoumon zugeschrieben werden, da die intrinsische Clearance unverändert bleibt (Tabelle 1).

Infolge dieses kompensatorischen Mechanismus' bleibt die Wirksamkeit von Phenprocoumon unter dem Einfluß von Tolbutamid unverändert. So kommt es zwar zu einer Linksverschiebung der Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung für Gesamtphenprocoumon, die C_p 50 %-Werte von freiem Phenprocoumon sind in beiden Gruppen aber identisch (Tabelle 3). Ebenso ergeben sich keine Unterschiede zwischen mit Tolbutamid behandelten Ratten und Kontrolltieren in der Wirkung pro Dosis (Tabelle 3).

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

Dreifache Unterschiede im freien Anteil von Phenprocoumon im Serum führen zu keiner wesentlichen Änderung der gerinnungshemmenden Wirksamkeit pro Dosis. Somit führt auch eine Verdrängung von Phenprocoumon aus seiner Serumproteinbindung durch Tolbutamid zu keiner wesentlichen Zunahme der Wirksamkeit. Da für Phenprocoumon sowohl der Wirkort als auch das arzneimittelabbauende Enzymsystem in der Leber

lokalisiert ist, führt eine Zunahme des freien Anteiles im Serum zu einer Zunahme der Konzentration sowohl am Wirkort als auch am arzneimittelabbauenden Enzymsystem. Hierdurch werden zwei Prozesse beeinflusst, die im Hinblick auf die Wirksamkeit entgegengesetzt gerichtet sind und sich deshalb kompensieren. Die Gesamtwirkung, gemessen an der Prothrombin-komplexaktivität im Plasma, bleibt unbeeinflusst.

DER EINFLUSS DES LEBENSALTERS AUF PHARMAKOKINETIK UND GERINNUNGSHEMMENDE WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON

In früheren Untersuchungen anderer Autoren (Husted und Andreasen, 1977; Shepherd et al., 1977; Routledge et al., 1979) wurde über eine erhöhte Empfindlichkeit sowohl älterer Patienten als auch von älteren Ratten gegenüber oralen Antikoagulantien berichtet. Auch für Phenprocoumon konnte hier eine Zunahme der gerinnungshemmenden Wirkung in älteren Ratten bestätigt werden, obwohl der Altersunterschied mit 12 bzw. 36 Wochen wesentlich geringer als in der Studie von Shepherd et al. (1977) war, die 11,5 und 86 Wochen alte Ratten untersucht hatten.

Wie für Warfarin (Shepherd et al., 1977) kommen auch für Phenprocoumon Unterschiede in der Pharmakokinetik als Ursache der erhöhten Empfindlichkeit der älteren Ratten nicht in Betracht. Die pharmakokinetischen Parameter der Elimination (biologische Halbwertszeit, fiktives Verteilungsvolumen, Plasmaclearance und intrinsische Clearance) sind in beiden Altersgruppen identisch. Auch in der Plasmaproteinbindung von Phenprocoumon bestehen keine altersbedingten Unterschiede (Abbildung 12, Tabelle 4). Als Folge der relativ kleineren Leber der älteren Ratten ist das Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis und der Dosisanteil von Phenprocoumon, der sich 54 Stunden nach der Verabreichung in der Leber befindet, bei diesen Tieren erhöht (Tabelle 5). Dies sollte jedoch ohne Auswirkung auf Elimination und

gerinnungshemmende Wirksamkeit sein, da die hierfür ursächliche freie, nicht gebundene Konzentration von Phenprocoumon in der Leber beider Gruppen nicht unterschiedlich ist (Tabelle 5).

Daher erschien es erforderlich, den Einfluß von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel in Abhängigkeit vom Lebensalter der Ratten zu untersuchen.

Es konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß die gerinnungshemmende Wirkung der Antikoagulantien vom Cumarin-Typ auf ihrer Fähigkeit beruht, in den Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus einzugreifen (Bell und Matschiner, 1972; Willingham und Matschiner, 1974; Ren et al., 1974; Whitlon et al., 1978).

Im Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus (Abbildung 22) entsteht aus dem mit der Nahrung aufgenommenen Vitamin K₁ in der Leber zunächst Vitamin K₁-hydrochinon (Sadowski et al., 1977). Ein daraus gebildetes, bisher ungeklärtes Zwischenprodukt (nach Larson und Suttie (1978) möglicherweise Vitamin K₁-hydroperoxid) ist für die γ -Carboxylierung von Glutaminsäureresten essentiell. Die resultierenden γ -Carboxy-Glutaminsäurereste sind zur Bindung von Ca⁺⁺-Ionen fähig. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Gerinnungsfaktoren des Prothrombinkomplexes (Faktoren II, VII, IX und X). Das bisher chemisch nicht definierte Zwischenprodukt wird durch eine mikrosomale Epoxidase (Willingham und Matschiner, 1974) zu Vitamin K₁-2,3-epoxid oxidiert. Dieses Epoxid wird anschließend durch eine bisher ebenfalls nicht isolierte Sulfhydrylgruppen-tragende Vitamin K₁-epoxid-Reduktase zum nativen Vitamin K₁ reduziert

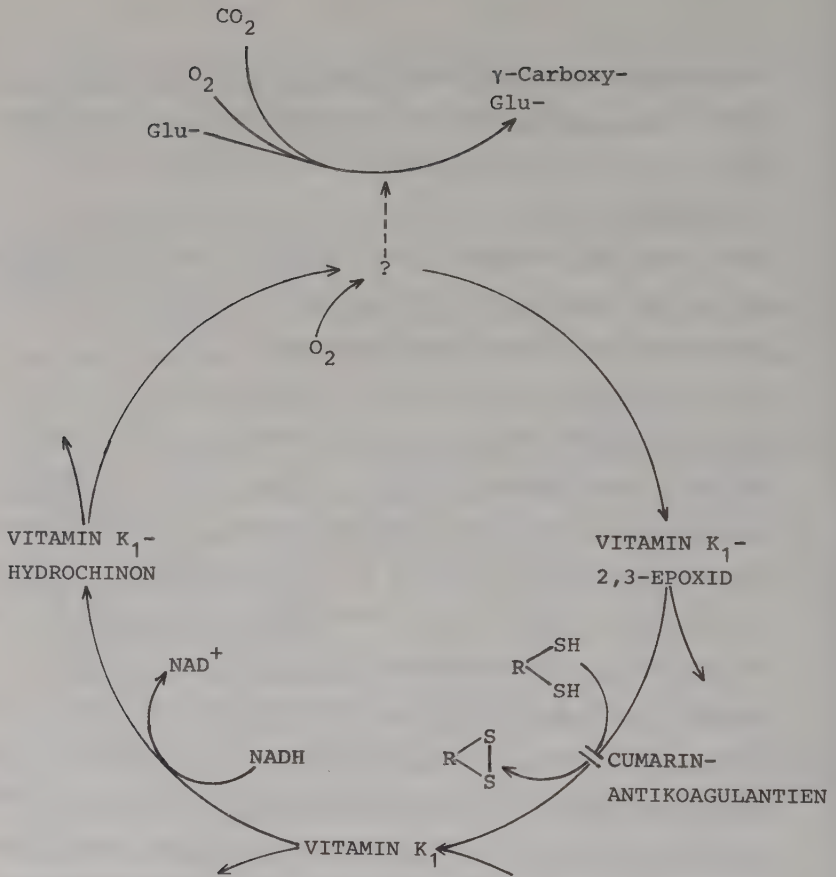


Abb. 22: Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus in der Leber (nach Bell, 1978; Whitlon et al., 1978)

Glu- : Glutaminsäure

(Bell und Matschiner, 1972; Willingham und Matschiner, 1974).

Die oralen Antikoagulantien vom Cumarin-Typ hemmen die Vitamin K_1 -epoxid-Reduktase (Willingham und Matschiner, 1974; Ren et al., 1977; Whitlon et al., 1978), wodurch es zu einer Kumulation von Vitamin K_1 -2,3-epoxid in der Leber (Matschiner et al., 1970; Caldwell et al., 1974; Sadowski und Suttie, 1974) und im Plasma (Shearer et al., 1977; Schmidt et al., 1979; Park et al., 1979) kommt. Gleichzeitig fällt auch der Spiegel von Vitamin K_1 durch die verminderte Regeneration aus dem Epoxid ab (Ren et al., 1974; Zimmermann und Matschiner, 1974; Ren et al., 1977).

Wie in Abbildung 14 und Tabelle 6 gezeigt, kommt es nach intravenöser Injektion einer Einzeldosis von $64,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Tritium-markiertem Vitamin K_1 und Vorbehandlung mit nicht-markiertem Phenprocoumon in Abhängigkeit von der Phenprocoumondosis folgerichtig zu einem Abfall der Vitamin K_1 -Konzentration und einem Anstieg des Vitamin K_1 -epoxides in der Leber (Tabelle 6). Diese Befunde stimmen mit den Beobachtungen von Caldwell et al. (1974) überein, die Ratten nach Vorbehandlung mit $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Warfarin eine Dosis von $50 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^3H -Vitamin K_1 injiziert hatten. Die höhere Gesamtradioaktivität in den Lebern der älteren Ratten beruht darauf, daß Vitamin K_1 bezogen auf das Körpergewicht dosiert wurde, das relative Lebergewicht aber mit fortschreitendem Alter der Ratten von im Mittel 2,98 % auf 2,34 % abnimmt (Tabelle 6). Das bedeutet, daß die älteren Ratten - bezogen auf das Lebergewicht - höhere Dosen von Vitamin K_1 verab-

reicht bekamen.

Daher wurde als quantitatives Maß für die Hemmung der Vitamin K₁-epoxid-Reduktase durch Phenprocoumon in den vorliegenden Untersuchungen das Verhältnis Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁ herangezogen, da dieses unabhängig von der Vitamin K₁-Konzentration in der Leber ist (Matschiner, 1970; Caldwell et al., 1974). In diesem Verhältnis fanden sich deutliche Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Ratten. Die älteren Tiere hatten nach Vorbehandlung mit den höchsten Phenprocoumondosen ein ca. 1,6-fach höheres Verhältnis von Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁ (Abbildung 16). Die höheren Verhältniszahlen der älteren Ratten beruhen auf dem wesentlich schnelleren Abfall der Vitamin K₁-Spiegel bei gleichzeitig deutlich vermehrter Bildung von Vitamin K₁-epoxid (Abbildung 14, Tabelle 6).

Trägt man das Verhältnis Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁ gegen die Phenprocoumondosis oder die in der Leber gemessene Phenprocoumonkonzentration auf, erhält man typische Dosis- oder Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen (Abbildung 16). Eine geringe Linksverschiebung der Kurve für alte Ratten fand sich in der Dosis-Wirkungs-Beziehung, da der ED₅₀-Wert mit 0,165 mg · kg⁻¹ gegenüber 0,200 mg · kg⁻¹ für ältere Ratten etwas niedriger war. Eine Linksverschiebung war in der Leberkonzentrations-Wirkungs-Beziehung nicht nachweisbar; hier wurden praktisch identische EC₅₀-Werte erhalten.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Affinität der Vitamin K₁-epoxid-Reduktase für Phenprocoumon in beiden Alters-

gruppen gleich ist, die Menge und/oder die Aktivität der Vitamin K₁-epoxid-Reduktase scheint dagegen in älteren Ratten geringer zu sein.

Der Metabolismus von Vitamin K₁ wird zumindest im Menschen qualitativ und quantitativ durch Phenprocoumon beeinflusst (Shearer et al., 1977). Während bei unbehandelten Probanden nahezu ausschließlich Vitamin K₁ nach β - oder ω -Oxidation der Phytylseitenkette und anschließender Glucuronidierung ausgeschieden wird, können bei mit Antikoagulantien vorbehandelten Probanden, in Abhängigkeit von der Dosis des Cumarinderivates, nur Metabolite des Epoxides nachgewiesen werden. Somit könnten die beobachteten Unterschiede im Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁-Verhältnis nicht nur eine Folge der unterschiedlichen Reduktasemenge oder Reduktaseaktivität sein, sondern wären auch erklärbar, wenn die Abbaugeschwindigkeit des Epoxides zu polarerer Metaboliten in beiden Altersgruppen verschieden wäre. Dies ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, wie Abbildung 15 und Tabelle 6 zeigen, wo in Abhängigkeit von der Phenprocoumondosis der Anteil der nichtidentifizierten Radioaktivität (hierbei handelt es sich in erster Linie um polare Metabolite des Vitamin K₁-epoxides) in der Leber dargestellt ist. Danach nimmt im Einklang mit Berichten in der Literatur (Shearer et al., 1977) die Menge der Metabolite mit steigender Phenprocoumondosis zu, doch ist insbesondere im Bereich von Phenprocoumondosen über $0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (wo praktisch nur noch polare Metabolite von Vitamin K₁-epoxid ausgeschieden werden) kein wesentlicher

Unterschied in der Menge der nichtidentifizierten Radioaktivität zwischen jungen und älteren Ratten nachweisbar.

Demnach kann das unterschiedliche Vitamin K₁-epoxid/Vitamin K₁-Verhältnis in jungen und älteren Ratten nicht auf einem unterschiedlichen Abbau des Vitamin K₁-epoxides zu polareren Metaboliten beruhen.

Ähnliche Unterschiede wie hier für jüngere und ältere Ratten gezeigt, fanden sich auch beim Vergleich von Cumarin-resistenten mit nicht-resistenten Ratten. So konnte gezeigt werden, daß in resistenten Ratten der Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus durch Warfarin wesentlich geringer beeinträchtigt wird als in nicht-resistenten Ratten (Bell und Caldwell, 1973; Zimmermann und Matschiner, 1974; Bell et al., 1976).

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

Ältere und jüngere männliche Inzucht-Lewis-Ratten unterscheiden sich in der Empfindlichkeit gegenüber Phenprocoumon. Die größere Empfindlichkeit der älteren Ratten beruht nicht auf Unterschieden in der Pharmakokinetik von Phenprocoumon, sondern auf der stärkeren Unterbrechung des Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus durch Phenprocoumon. Ursächlich hierfür ist eine verminderte Menge und/oder Aktivität der Vitamin K₁-epoxid-Reduktase mit fortschreitendem Alter.

DER EINFLUSS DES GESCHLECHTES AUF PHARMAKOKINETIK UND GERINNUNGSHEMMENDE WIRKSAMKEIT VON PHENPROCOUMON

Bereits 1931 wurde von Nicholas und Barron über geschlechtsbedingte Unterschiede in der Dosierung von Arzneimitteln berichtet. Sie fanden, daß zur Narkotisierung von weiblichen Ratten nur die Hälfte der Dosis von Amobarbital benötigt wurde wie für männliche Tiere. Die ersten Hinweise auf eine erhöhte Empfindlichkeit weiblicher Ratten gegenüber oralen Antikoagulantien stammen aus dem Jahre 1953 von Hagan und Radomski, die im Rahmen toxikologischer Studien eine fast sechsfach niedrigere LD_{50} von Warfarin für weibliche Ratten ermittelten.

Für Phenprocoumon fand sich in dieser Untersuchung nach Verabreichung einer intravenösen Einzeldosis von $0,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Phenprocoumon in weiblichen Ratten ebenfalls eine größere gerinnungshemmende Wirkung als in männlichen Tieren. Dieser Befund ist insofern erstaunlich, als das Plasma weiblicher Ratten wesentlich gerinnungsaktiver als das männlicher Tiere ist. So hatten weibliche, unbehandelte Tiere eine Gerinnungszeit von $16,3 \pm 0,5$ Sekunden, männliche Tiere eine Gerinnungszeit von $21,7 \pm 1,0$ Sekunden. Diese gesteigerte Gerinnungsaktivität des Plasmas weiblicher Tiere ist auf eine höhere Konzentration der Gerinnungsfaktoren II, VII und X zurückzuführen (Pyörälä, 1965).

Wenn als Maß für die Wirksamkeit nicht die verabreichte Dosis, sondern die Plasmakonzentration von Phenprocoumon,

die eine definierte gerinnungshemmende Wirkung hervorruft, zugrunde gelegt wird, zeigt sich, daß weibliche Ratten unempfindlicher als männliche Tiere reagieren. So benötigen weibliche Ratten für eine 50 %-ige Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes eine etwa doppelt so hohe Plasmakonzentration an freiem oder Gesamtphenprocoumon wie männliche Tiere (Tabelle 9).

Der scheinbare Widerspruch, daß die unempfindlicheren weiblichen Ratten eine größere Wirksamkeit pro Dosis Phenprocoumon zeigen als die männlichen Tiere, ist somit das Ergebnis zweier hinsichtlich der Wirksamkeit entgegengesetzter Prozesse. Zum einen reagieren weibliche Ratten aufgrund der höheren Konzentration der Gerinnungsfaktoren primär unempfindlicher auf Phenprocoumon, zum anderen dürften Veränderungen der Pharmakokinetik zu einer Zunahme der Empfindlichkeit führen. Dieser letztere Effekt scheint hinsichtlich der Wirksamkeit pro Dosis zu überwiegen.

In der Pharmakokinetik von Phenprocoumon unterscheiden sich weibliche von männlichen Ratten sowohl in den Parametern der Eliminationskinetik als auch in der Verteilung des Arzneistoffes. Die biologische Halbwertszeit war in weiblichen Ratten etwa um 50 % länger als in männlichen Tieren, das fiktive Verteilungsvolumen war nur etwa halb so groß, und die Plasmaclearance etwa ein Drittel der Clearance der männlichen Ratten (Abbildung 17, Tabelle 7).

Die stark reduzierte Plasmaclearance der weiblichen Ratten ist zum einen die Folge eines reduzierten Verteilungsvolumens. Maßgeblich hierfür ist das Verhältnis Plasmaproteinbindung zu Gewebsbindung, da nach Gibaldi und McNamara (1977) zwischen dem Verteilungsvolumen (V_d) und dem freien Anteil eines Arzneistoffes im Plasma (f_p) bzw. im Körpergewebe (f_K) die Beziehung

$$V_d = V_p + \frac{f_p}{f_K} \cdot V_T$$

besteht, wobei V_T das Volumen des Gesamtkörperwassers nach Abzug des Plasmavolumens V_p ist (bei Ratten $660 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ minus $42 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} = 618 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$). So ist das Verhältnis freier Anteil im Plasma zu freiem Anteil im Körpergewebe bei weiblichen Ratten $0,36 \pm 0,07$, in männlichen Tieren aber $0,88 \pm 0,16$.

Aufgrund des geringeren Verteilungsvolumens ist die Gesamtkonzentration von Phenprocoumon im Plasma weiblicher Ratten wesentlich höher als in männlichen Tieren (Abbildung 17). Durch diese höhere Gesamtkonzentration von Phenprocoumon im Plasma ist auch die freie Konzentration im Plasma weiblicher Ratten wesentlich höher (Abbildung 17), obwohl der freie Anteil von Phenprocoumon im Plasma weiblicher Ratten geringer als im Plasma männlicher Tiere ist. Die höhere freie Konzentration im Plasma weiblicher Ratten führt zu einer starken Zunahme der Gesamtkonzentration in der Leber der weiblichen Tiere (Tabelle 8). Da die Bindung an das Lebergewebe in beiden Geschlechtern nicht wesentlich

unterschiedlich ist (Tabelle 8), führt die stärkere Zunahme der Gesamtkonzentration in der weiblichen Leber demzufolge auch zu einer Zunahme der für die Wirksamkeit und den Stoffwechsel entscheidenden freien Konzentration von Phenprocoumon (Tabelle 8).

Die erwartete schnellere Metabolisierung von Phenprocoumon in der Leber weiblicher Ratten durch die erhöhte freie Konzentration bleibt aber aus, da die metabolische Kapazität der weiblichen Leber geringer zu sein scheint. Dieser Effekt wird augenscheinlich, wenn man die intrinsische Eliminationskonstante von weiblichen und männlichen Ratten vergleicht. Sie ist ein Maß für die Aktivität des metabolisierenden Enzymsystems und war in männlichen Ratten etwa dreimal größer als in weiblichen Tieren (Tabelle 8). In gleicher Weise war auch die intrinsische Clearance (Clearance der freien Konzentration von Phenprocoumon) in weiblichen Ratten reduziert (Tabelle 7).

Eine höhere Stoffwechselaktivität der Leber männlicher Ratten wurde u.a. auch für Carisoprolol, Pentobarbital (Kato et al., 1962) und andere Barbiturate (Holck et al., 1937) nachgewiesen. Als Ursache vermutete Kato (1974) eine erhöhte Bindungskapazität des mikrosomalen Cytochrom P 450 für die Substrate, die durch die anabole Wirkung von Androgenen hervorgerufen wird. So konnten Kato et al. (1962) in einer Studie an männlichen und weiblichen Ratten zeigen, daß die primär vorhandenen geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Metabolisierungsgeschwindigkeit von Cariso-

prololl nach Kastration der Ratten verschwinden. Nach Vorbehandlung der kastrierten Tiere mit Androgenen metabolisieren beide Geschlechter das Arzneimittel so schnell wie unbehandelte Männchen, während eine Vorbehandlung mit Östrogenen keinen Einfluß hat.

Gegenüber den dreifachen Unterschieden in der intrinsischen Eliminationskonstante waren die Unterschiede in der biologischen Halbwertszeit bzw. der apparenten Eliminationskonstanten zwischen weiblichen und männlichen Ratten mit ca. 50 % nur gering. Dieser Effekt läßt sich damit erklären, daß die *in vivo* ermittelte apparente Eliminationskonstante k_{app} eine Funktion der intrinsischen Eliminationskonstante k_{intr} und des Dosisanteiles F von Phenprocoumon in der Leber ist (Levy et al., 1968; Nagashima und Levy, 1969; Levy, 1970; Jähnchen und Levy, 1974):

$$k_{app} = k_{intr} \cdot F$$

Die Verdoppelung des Dosisanteiles F in der Leber weiblicher Ratten kompensiert teilweise die starke Abnahme der intrinsischen Eliminationskonstante k_{intr} in diesen Tieren (Tabelle 8). Daher sind die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten in der apparenten Eliminationskonstante geringer als die Unterschiede in der intrinsischen Eliminationskonstante.

Somit ist einerseits die höhere freie Konzentration von Phenprocoumon in der Leber und andererseits die niedrigere Aktivität des metabolisierenden Enzymsystems in der Leber

weiblicher Ratten für die größere Wirksamkeit einer gegebenen Phenprocoumondosis verantwortlich, trotz der Tatsache, daß - bezogen auf gleiche Plasmakonzentrationen von Phenprocoumon - weibliche Ratten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Phenprocoumon besitzen als männliche Tiere.

Wesentliche Unterschiede im Einfluß von Phenprocoumon auf den Vitamin K_1 -Epoxid-Zyklus in der Leber ließen sich zwischen weiblichen und männlichen Ratten nicht nachweisen.

Nach Verabreichung einer Einzeldosis von Vitamin K_1 und Vorbehandlung mit Phenprocoumondosen von 0,02 bis 1,00 mg $\cdot$ kg⁻¹ kommt es erwartungsgemäß mit steigender Antikoagulantendosis zu einem gleichförmigen Abfall der Vitamin K_1 -Konzentration und einem Anstieg des Vitamin K_1 -2,3-epoxides in der Leber beider Geschlechter (Abbildung 19, Tabelle 10). Das Verhältnis Vitamin K_1 -epoxid/Vitamin K_1 , das als quantitatives Maß für die Hemmung der Vitamin K_1 -epoxid-Reduktase dient (Caldwell et al., 1974; Ren et al., 1974; Sadowski und Suttie, 1974), steigt in beiden Geschlechtern mit Erhöhung der Phenprocoumondosis an, ohne daß sich wesentliche Unterschiede im Verlauf sowohl der Dosis- als auch der Leberkonzentrations-Wirkungs-Beziehung erkennen lassen (Abbildung 20).

Somit sind die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten in der Empfindlichkeit gegenüber Phenprocoumon nicht mit Unterschieden in der Konzentration oder der Aktivität der Vitamin K₁-epoxid-Reduktase, die nach bisherigen Vorstellungen den Rezeptor für orale Antikoagulantien darstellt, zu erklären. Vielmehr dürfte die verschiedene Empfindlichkeit sowohl auf Unterschieden in der Pharmakokinetik als auch auf geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Konzentration an Gerinnungsfaktoren beruhen.

IV. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Serumproteinbindung und der physiologischen Faktoren Lebensalter und Geschlecht auf die Pharmakokinetik und die gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon in Ratten untersucht.

Um die Beziehung zwischen Serumproteinbindung, Eliminationskinetik, Verteilung und gerinnungshemmender Wirksamkeit von Phenprocoumon in Ratten zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt. Zum einen wurde diese Beziehung in Auszucht-Sprague-Dawley Ratten mit genetisch bedingten Unterschieden im Ausmaß der Serumproteinbindung charakterisiert. Zum anderen wurde in Inzucht-Lewis-Ratten, die sich hinsichtlich der gemessenen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter von Phenprocoumon homogen verhalten, die Serumproteinbindung durch gleichzeitige Behandlung mit Tolbutamid modifiziert. Tolbutamid verdrängt Phenprocoumon aus seiner Serumproteinbindung ohne gleichzeitig dessen Stoffwechsel zu beeinflussen.

In Ratten mit genetisch bedingten Unterschieden in der Serumproteinbindung fanden sich positive, lineare Beziehungen zwischen dem freien Anteil im Serum und der apparenten Eliminationskonstante, der Plasmaclearance und

dem Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis von Phenprocoumon. Der freie Anteil von Phenprocoumon im Lebergewebe war in diesen Ratten nicht wesentlich verschieden und unabhängig vom freien Anteil im Serum. Dagegen nahm die freie Konzentration von Phenprocoumon in der Leber mit steigender freier Konzentration im Serum zu. Somit ist die Eliminationsgeschwindigkeit von Phenprocoumon eine Funktion der Serumproteinbindung.

Mit steigendem freien Anteil von Phenprocoumon im Serum kam es zu einer Linksverschiebung der Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung von Gesamtphenprocoumon, das heißt, je höher der freie Anteil im Serum, um so niedriger war die Gesamtplasmakonzentration von Phenprocoumon, die für eine definierte Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes erforderlich war. Demgegenüber fanden sich zwischen den Tieren nur etwa 1,8-fache Unterschiede in der gerinnungshemmenden Wirksamkeit pro Dosis (definiert als Fläche über der Prothrombinkomplexaktivität-Zeit-Kurve). Die Größe dieser Fläche war unabhängig vom Ausmaß der Serumproteinbindung von Phenprocoumon. Die beobachteten geringen Unterschiede in diesen Flächen ließen sich mit einer unterschiedlichen intrinsischen Empfindlichkeit der Tiere gegenüber Phenprocoumon erklären.

Ähnliche Ergebnisse wurden in Inzucht-Lewis-Ratten erhalten, in denen die Serumproteinbindung von Phenprocoumon durch gleichzeitige kontinuierliche Verabreichung von Tolbutamid verringert wurde. Die Tolbutamidbehandlung

führte zu einer Verdoppelung des freien Anteiles von Phenprocoumon im Serum, des Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnisses und der Plasmaclearance von Phenprocoumon. Die intrinsische metabolische Clearance wurde durch Tolbutamid nicht beeinflusst. Unter der Behandlung mit Tolbutamid kam es zu einer Linksverschiebung der Plasmakonzentrations-Wirkungs-Beziehung von Gesamtphenprocoumon, während diese Beziehung für freies Phenprocoumon unbeeinflusst blieb. Auch in der gerinnungshemmenden Wirksamkeit pro Dosis fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Diese Ergebnisse in Ratten zeigen, daß die gerinnungshemmende Wirksamkeit von Phenprocoumon pro Dosis unabhängig vom Ausmaß der Serumproteinbindung ist. Da für Phenprocoumon der Rezeptor und die metabolisierenden Enzyme in der Leber lokalisiert sind, führt eine Zunahme des freien Anteiles im Serum zu einem Anstieg der freien Arzneimittelkonzentration sowohl am Wirkort als auch am abbauenden Enzymsystem. Die resultierenden Effekte sind hinsichtlich der Gesamtwirkung von Phenprocoumon entgegengesetzt gerichtet und kompensieren sich letztlich.

Mit steigendem Lebensalter nimmt die Empfindlichkeit gegenüber oralen Antikoagulantien zu. Es stellte sich daher die Frage, ob hierfür Unterschiede in der Pharmakokinetik oder Unterschiede in der Pharmakodynamik von Phenprocoumon verantwortlich sind. Zwischen jüngeren (Alter 12 Wochen) und älteren männlichen Ratten (Alter 36 Wochen)

fanden sich keine Unterschiede in der Plasmaproteinbindung, der biologischen Halbwertszeit, im Verteilungsvolumen, in der Verteilung von Phenprocoumon zwischen Plasma und Leber, und in der freien Konzentration des Arzneimittels in der Leber. Somit lassen sich die altersbedingten Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Phenprocoumon nicht mit Änderungen der Pharmakokinetik erklären.

Dagegen fanden sich deutliche Unterschiede im Einfluß von Phenprocoumon auf den Vitamin K_1 -Epoxid-Zyklus in der Leber. Das Verhältnis Vitamin K_1 -epoxid/Vitamin K_1 , das das Ausmaß der Hemmung der Vitamin K_1 -epoxid-Reduktase durch Phenprocoumon widerspiegelt, war in älteren Ratten größer als in jüngeren Ratten. Die Analyse der Dosis- bzw. Leberkonzentrations-Wirkungs-Beziehungen ergab nahezu identische ED_{50} - und EC_{50} -Werte (Dosis- bzw. Leberkonzentration von Phenprocoumon, die für einen halbmaximalen Anstieg des Vitamin K_1 -epoxid/Vitamin K_1 -Verhältnisses erforderlich ist), aber eine etwa 1,6-fach größere maximale Wirkung in älteren Ratten. Der Metabolismus von Vitamin K_1 -epoxid zu polaren Metaboliten war dagegen in jüngeren und älteren Tieren nicht verschieden.

Demnach läßt sich die größere gerinnungshemmende Wirkung von Phenprocoumon in älteren Ratten mit einer verringerten Menge und/oder Aktivität der Vitamin K_1 -epoxid-Reduktase erklären. Dieses Enzym stellt nach neueren Untersuchungen den Rezeptor für die oralen Antikoagulantien vom

Cumarin-Typ dar.

Zwischen männlichen und weiblichen Ratten bestehen deutliche geschlechtsabhängige Unterschiede in der Pharmakokinetik und der gerinnungshemmenden Wirksamkeit von Phenprocoumon.

So war die freie Arzneimittelkonzentration im Plasma weiblicher Ratten höher als in männlichen Ratten. Dementsprechend fanden sich auch in den Lebern der weiblichen Tiere höhere Konzentrationen sowohl von freiem als auch von Gesamtphenprocoumon. Gleichzeitig war in weiblichen Tieren die intrinsische metabolische Clearance von Phenprocoumon deutlich geringer als in männlichen Ratten. Die höhere freie Konzentration von Phenprocoumon in der Leber und die gleichzeitig reduzierte metabolische Clearance von Phenprocoumon in weiblichen Ratten erklären die - im Vergleich zu männlichen Tieren - größere gerinnungshemmende Wirksamkeit pro Dosis.

Die freie Konzentration von Phenprocoumon im Plasma, die für eine 50 %-ige Hemmung der Syntheserate des Prothrombin-komplexes erforderlich ist, war in weiblichen Ratten höher als in männlichen Tieren. Es fanden sich jedoch keine geschlechtsbedingten Unterschiede im Einfluß von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel. Die verminderte intrinsische Empfindlichkeit weiblicher Ratten gegenüber Phenprocoumon beruhte vielmehr auf einer höheren Konzentration von Gerinnungsfaktoren im Plasma dieser Tiere. Hier-

durch werden die geschlechtsbedingten Unterschiede in der Pharmakokinetik, die insgesamt zu einer Zunahme der gerinnungshemmenden Wirksamkeit von Phenprocoumon in weiblichen Ratten führen, teilweise kompensiert.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Versuchstiere

Zur Untersuchung der interindividuellen Unterschiede in der Serumproteinbindung, der Pharmakokinetik und der Wirksamkeit von Phenprocoumon wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Auszucht-Linie, WIGA-Versuchstierzucht, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 300 - 450 g verwendet.

Die Pharmakokinetik und die Wirksamkeit von Phenprocoumon unter dem Einfluß von Tolbutamid wurden in männlichen Inzucht-Lewis-Ratten mit einem Körpergewicht von 340 - 380 g untersucht.

Der Einfluß des Lebensalters auf die Pharmakokinetik und die Wirksamkeit von Phenprocoumon wurde in jungen (Alter ca. 12 Wochen) und älteren männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Alter ca. 36 Wochen) untersucht. Die Versuche zu den Geschlechtsunterschieden in der Pharmakokinetik und der Wirksamkeit von Phenprocoumon wurden an weiblichen (Gewicht 240 - 265 g) und männlichen Inzucht-Lewis-Ratten (Gewicht 280 - 305 g) durchgeführt.

Die Inzucht-Lewis-Ratten wurden alle vom Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover bezogen.

Die Tiere wurden konventionell gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Altromin®, Fa. Altromin, Lage).

2. Arzneimittel

Racemisches Phenprocoumon, ein Gemisch aus gleichen Teilen von R (+)-Phenprocoumon, spezifische Drehung $+114^{\circ}$ (3,4 % in Methanol) und S (-)-Phenprocoumon, spezifische Drehung $-113,8^{\circ}$ (3,8 % in Methanol)

^3H -Phenprocoumon, markiert in der Alkylseitenkette, spezifische Aktivität $803 \mu\text{Ci} \cdot \text{mg}^{-1}$ bzw. $773 \mu\text{Ci} \cdot \text{mg}^{-1}$

Vitamin K_1 -2,3-epoxid, synthetisiert nach der Methode von Tishler et al. (1940)

Tolbutamid, Fa. C.H. Boehringer, Mannheim

Heparin-Natrium, Nordmark-Werke GmbH, Hamburg

3. Verabreichung der Arzneimittel

Phenprocoumon wurde in einigen Tropfen 0,5 N NaOH gelöst und mit physiologischer Kochsalzlösung auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Die Applikation erfolgte durch Injektion mit Tuberkulinspritzen und Kanülen Nr. 20 in die Penisvene.

Vitamin K_1 wurde in der Menge Tween 80 gelöst, die nach Einstellung mit physiologischer Kochsalzlösung eine Endkonzentration von 5 % nicht überschritt. Die Verabreichung erfolgte in analoger Weise. Abweichend davon wurde bei der Untersuchung der Pharmakokinetik von Phenprocoumon in männlichen und weiblichen Ratten die Arzneistofflösung in

eine der Schwanzvenen der Tiere injiziert. Zur Untersuchung der Wirkung von Phenprocoumon auf den Vitamin K₁-Stoffwechsel in männlichen und weiblichen Ratten wurden die Tiere mit intraperitoneal verabreichtem Phenprocoumon bzw. mit Kochsalzlösung vorbehandelt, während Vitamin K₁ wiederum in eine der Schwanzvenen verabreicht wurde.

Tolbutamid wurde als Lösung aus Ampullen entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mittels einer Schlundsonde verabreicht. Dabei erhielten die Tiere eine Stunde vor der Phenprocoumoninjektion eine Dosis von $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, danach alle vier Stunden jeweils eine Erhaltungsdosis von $62,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ verabreicht.

Alle Lösungen wurden stets frisch hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, daß das Injektionsvolumen je nach Körpergewicht zwischen 0,6 und 1,0 ml lag.

4. Probengewinnung

Die Entnahme der Blutproben bei Ratten erfolgte nach Wingard und Levy (1973) durch Punktion der medial und ventral im Schwanz der Tiere verlaufenden Arterie unter leichter Narkose mit Diäthyläther. Die Punktion erfolgte mit einer sterilen Einmalkanüle mit Luer-Look-Aufsatz (21 G 1/2, 40/8; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), auf die ein vorher geeichter Polyäthylenschlauch (Innendurchmesser 3 mm) aufgesetzt war. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Blut in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß Nr. 3810

(Eppendorf-Gerätebau, Nethelen und Hinz GmbH, Hamburg) überführt, mit vorgelegten 0,05 ml Natrium-Oxalatlösung (1,34 g di-Natriumoxalat und 0,7 g Natriumchlorid in 100 ml Wasser) vermischt und damit ungerinnbar gemacht. Der Hämatokrit wurde nach Aufziehen einer kleinen Menge Blut in ein heparinisiertes Kapillarröhrchen zur Mikrohämatokritbestimmung (Fa. W U, Mainz), Verschuß desselben mit Versiegelungswachs (Mikrohämatokrit-Versiegelungswachs, Fa. Brand, Wertheim) und anschließender Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge mit speziellem Einsatz (Beckman Mikrofuge B, Fa. Beckman, München) wie üblich bestimmt.

Die restliche Blutprobe wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge Modell 3200 bei $12000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ zwei Minuten lang zentrifugiert, das überstehende Plasma mit einer Pasteurpipette abgehoben, und in einem zweiten Eppendorf-Reaktionsgefäß bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zur Gewinnung von Leberhomogenat wurde der Bauchraum der Ratten unter Äthernarkose eröffnet und die Tiere durch Punktion der Bauchorta entblutet. Das gewonnene Blut wurde zur Abtrennung von Serum bzw. Plasma bei $4500 \text{ U} \cdot \text{Min}^{-1}$ 15 Minuten lang zentrifugiert. Die Leber wurde herauspräpariert, durch vorsichtiges Abtupfen unter leichtem Druck von Blutresten befreit und evtl. noch vorhandenes Bindegewebe entfernt. Nach grober Zerkleinerung mit einer Gewebsschere wurden die Lebern mit einem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen i.Br.) in eiskalte

physiologische Kochsalzlösung im Verhältnis 1 Teil Leber / 3 Teile Kochsalzlösung eine Minute lang bei $3000 \text{ U} \cdot \text{Min.}^{-1}$ homogenisiert. Das Leberhomogenat wurde ebenfalls bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Zur Gallegewinnung wurde bei einer durch intraperitoneale Injektion von 2,0 ml Urethanlösung (20 %) narkotisierten Ratte der Bauchraum kurz eröffnet und der Gallengang durch Einführung eines Polyäthylenschlauches (Innendurchmesser 0,8 mm) kanuliert. Nach Verabreichung eines Gemisches ^3H -Phenprocoumon/Phenprocoumon in einer Gesamtdosis von $0,42 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ wurde die Galle in Intervallen von 30 Minuten über insgesamt 6 Stunden in Eppendorf-Gefäßen Nr. 3810 gesammelt. Nach Bestimmung des Gallenvolumens mit einer $100 \mu\text{l}$ Hamiltonspritze (Hamilton Company, Reno, USA) wurde die Galle bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Während des Versuches wurden bei der Ratte kontinuierlich Atmung, Reflexe und Körpertemperatur überwacht. Nach ca. 3 Stunden wurden zusätzlich 0,5 ml Urethanlösung zur Aufrechterhaltung der Narkose verabreicht.

Zur Untersuchung der Urinausscheidung von Phenprocoumon wurde eine Ratte, die ein Gemisch von ^3H -Phenprocoumon und nichtmarkiertem Phenprocoumon ($0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) unter leichter Äthernarkose intravenös injiziert bekommen hatte, über 11 Tage im Stoffwechselkäfig gehalten, wodurch eine genaue Bilanzierung der Nahrungs- und Flüssigkeitsein- und -abfuhr sowie die getrennte Sammlung von Urin und Kot möglich

war. Der Urin wurde bis zum vierten Tag nach der Phenprocoumoungabe in 12-stündigen Intervallen, danach im 24-Stunden-Rhythmus in tarierten Kolben aufgefangen und anschließend bei -20°C eingefroren.

5. Bestimmung der Prothrombinkomplexaktivität

Die Aktivität des Prothrombinkomplexes wurde nach Quick (1966) mit einem Koagulometer nach Schnitger und Gross bestimmt. Zur Bestimmung wurde Thromborel® (Behringwerke, Marburg), ein in sterilem Wasser zu lösendes, lyophilisiertes, Calcium-haltiges Human-Thromboplastin aus Placenten, verwendet.

Für die gesamte Gerinnungsanalyse wurde ausschließlich Plastikmaterial benutzt, um eine Voraktivierung durch Kontakt mit der rauhen Glasoberfläche zu verhindern. Allen angegebenen Werten liegen Doppelbestimmungen zugrunde.

Aufgrund der nur geringen Plasmamengen (0,2 - 0,3 ml), die für die gesamte Analytik zur Verfügung standen, konnten nur 0,01 ml Plasma eingesetzt werden, die jedoch mit 0,09 ml inaktiviertem Verdünnungsplasma (s.u.) auf das erforderliche Volumen von 0,1 ml aufgefüllt wurden. Zusätzlich erhöhte sich durch die beträchtlich verlängerten Gerinnungszeiten die Genauigkeit der Bestimmung.

Das Plasma (0,1 ml) wurde dann für 30 Sekunden bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml mindestens 15 Minuten vorgewärmter Thromboplastinlösung wurde die Zeit bis

zum Eintritt der Gerinnung gemessen.

Die Umrechnung der ermittelten Gerinnungszeit in Prozent der normalen Prothrombinkomplexaktivität erfolgt anhand einer für jede Charge Thromborel® neu zu erstellenden Bezugskurve, die durch Verdünnung des Mischplasmas von mindestens 5 Ratten des gleichen Geschlechts und des gleichen Stammes mit inaktiviertem Verdünnungsplasma für den Bereich von 100 bis 10 % erstellt wird.

Die Verdünnung des Rattenplasmas muß mit inaktiviertem Plasma erfolgen, damit die Fibrinogenkonzentration nicht zum limitierenden Faktor wird, und dadurch die Gerinnung nur von den sogenannten Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie von Faktor V abhängig ist.

Verdünnungsplasma (Quick, 1966) wird aus Rattenplasma durch Zusatz von Bariumsulfat ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) nach dreimaliger Inkubation (je 1 Minute inkubiert, 15 Sekunden schütteln) und anschließender Zentrifugation (5 Minuten bei $4500 \text{ U} \cdot \text{Min.}^{-1}$) hergestellt. Es gilt als inaktiviert, wenn nach Zusatz von 0,2 ml Thromboplastinreagenz innerhalb von 10 Minuten keine Gerinnung eintritt.

6. Arzneimittelanalyse

6.1.0 Phenprocoumon

6.1.1 Fluorimetrie

Die quantitative Bestimmung von Phenprocoumon in den Lebern der Ratten, denen zur Untersuchung des Vitamin K₁-Stoffwechsels ³H-Vitamin K₁ und nichtmarkiertes Phenprocoumon verabreicht wurden, erfolgte mit einer bereits veröffentlichten fluorimetrischen Methode (Schmidt und Jähnchen, 1977).

Dazu wurden 4 ml Leberhomogenat mit 4 ml Citratpuffer und 10 ml Dichloräthan versetzt, 30 Minuten bei 150 U · Min.⁻¹ extrahiert und 10 Minuten bei 2000 U · Min.⁻¹ zentrifugiert. Die wässrige Phase und das Leberpellet wurden dann mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, 8 ml Dichloräthan-Phase in ein zweites Glas pipettiert und 15 Minuten mit 3 ml 0,5 N NaOH-Lösung geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten/3000 U · Min.⁻¹) wurden 2,5 ml der wässrigen, alkalischen Phase abgehoben, mit einem Milliliter 3 N HCl angesäuert und mit 5 ml n-Heptan wie zuvor extrahiert. Im letzten Schritt wurde der Arzneistoff aus 4 ml organischer (n-Heptan-) Phase in 3 ml 0,5 N NaOH-Lösung überführt. Nach dem Absaugen der organischen Phase mittels einer Eppendorf-Pumpe Modell 300 VDSK (Eppendorf-Gerätebau, Nethelen und Hinz GmbH, Hamburg) wurde die alkalische wässrige Phase zur Messung in

Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) mit einem Fassungsvermögen von 3 ml gefüllt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Perkin-Elmer-Fluorimeter Modell 204 (Perkin-Elmer & Co GmbH, Überlingen) bei 390 nm und einer Anregungswellenlänge von 313 nm. Der Nullpunkt wurde mit der stets frisch bereiteten und zur Extraktion benutzten Natronlauge eingestellt. Der obere Skalenpunkt wurde mit einem frisch angesetzten Phenprocoumon-Standard ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) fixiert. Zur zusätzlichen Überprüfung der Geräteeinstellung diente ein haltbarer Chinidin-Standard ($0,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in $0,1 \text{ N}$ Schwefelsäure), der unter diesen Bedingungen eine definierte Extinktion aufweist. Die Wiederfindung im Bereich von $0,5$ bis $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Leberhomogenat betrug konzentrationsunabhängig $84,6 \pm 1,3 \%$ ($n = 17$). Die Berechnung der Phenprocoumonkonzentration erfolgte anhand einer mitgeführten Eichreihe mit $0, 1, 2, 3$ und $4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Leber. Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen sind stets auf g Leber bezogen.

Prüfung auf Interferenz mit anderen Arzneistoffen oder deren Metabolite

Der beschriebene fluorimetrische Analysengang wurde durch die Anwesenheit von Vitamin K_1 bzw. dessen Metabolite nicht gestört.

Dies wurde durch Zugabe von Vitamin K_1 und Vitamin K_1 -2,3-epoxid zu Phenprocoumon-Eichreihen und durch Zusatz

von Phenprocoumon-Eichreihen zum Leberhomogenat von Ratten, denen Vitamin K₁ verabreicht worden war, überprüft.

Mit Tritium-markiertem Vitamin K₁ konnte gezeigt werden, daß in den alkalischen Lösungen, in denen Phenprocoumon fluorimetrisch bestimmt wurde, schließlich nur noch Spuren (0,07 %) der vor dem Analysengang zugesetzten Radioaktivität vorhanden waren.

6.1.2 Szintillations-Spektrometrie

Die geringen Mengen an Plasma (0,2 - 0,3 ml), die für die gesamte Analytik zur Verfügung standen, und die nicht ausreichende Empfindlichkeit der fluorimetrischen Methode zur Phenprocoumonbestimmung nach Verabreichung von Dosen von 0,34 - 0,38 mg · kg⁻¹ bedingten, daß den Ratten Gemische von radioaktiv markiertem und nichtmarkiertem Phenprocoumon verabreicht werden mußten. Die quantitative Analyse konnte dann nach einer beschriebenen Methode (Schmidt und Jähnchen, 1979) in jeweils 0,1 ml Plasma oder Leberhomogenat durchgeführt werden. Die Probe wurde mit 0,5 ml Citratpuffer versetzt und mit 2,5 ml n-Heptan über 30 Minuten extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurden 2 ml Heptanphase in ein Polyäthylenszintillationsgefäß (Best.-Nr. 714-1B, Fa. W. Zinsser, Frankfurt/Main) pipettiert, mit 10 ml Szintillationslösung (Quickszint 402, Fa. W. Zinsser, Frankfurt/Main) gemischt, und in einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3380 (Packard

Instruments Company, Inc., Downers Grove, Ill., USA) die Fluoreszenz gemessen.

Anhand eines ausgedruckten Kanalverhältnisses, das vom Gerät nach der Methode des externen Standards ermittelt wurde, konnte mit Hilfe einer Quenchkurve, die mit einem in Toluol gelösten Tritium-Standard erstellt wurde, die Zählausbeute ermittelt und die ausgedruckten Werte entsprechend umgerechnet werden. Die Wiederfindung lag konzentrationsunabhängig aus Plasma bei über 95 % ($n = 24$), während sie aus Leberhomogenat $71,1 \pm 1,5$ % ($n = 20$) betrug.

Spezifität der Methode

Die Spezifität der Extraktion mit n-Heptan wurde in Urin und Galle, wo aufgrund der Stoffwechselwege die höchsten Metabolitenkonzentrationen zu erwarten waren, überprüft.

Zur Bestimmung von unverändertem Phenprocoumon und seiner hydroxylierten Metabolite (Haddock et al., 1975) wurden jeweils 0,5 ml Galle oder Urin mit 1,5 ml Walpole-Acetat-Puffer und 0,005 ml β -Glucuronidase für 6 Stunden bei 37°C inkubiert, um zunächst die Glucuronide aufzuspalten. Danach wurden die Proben mit 3 ml Wasser verdünnt, durch Zugabe von 1 ml 3 N Salzsäure stärker angesäuert, dann dreimal mit je 20 ml Diäthyläther über 30 Minuten extrahiert und anschließend zentrifugiert. Die vereinigten

Ätherextrakte wurden zweimal mit je 2 ml 1,5 N Salzsäure gewaschen. Nach dem Ausfrieren des im Äther gelösten Wassers durch Kühlung der Gläser mit flüssigem Stickstoff auf -78°C wurden die abgehobenen Ätherphasen im Spitzglas unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

Zur Bestimmung von ausschließlich unverändertem Phenprocoumon wurden die wie oben vorbehandelten Ansätze dreimal mit n-Heptan extrahiert und die vereinigten Heptanextrakte ohne weitere Aufreinigung direkt im Spitzglas eingedampft.

Die Rückstände wurden in zweimal 0,05 ml Aceton aufgenommen und auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator übertragen. Nach Überschichtung mit nichtmarkiertem Phenprocoumon wurde mit Hilfe eines Laufmitteligemisches Chlchloroform/Essigsäure (99/1 v/v) über eine Laufstrecke von 10 cm einmal (Urinextrakte, R_f von Phenprocoumon = 0,45) bzw. zur besseren Auftrennung zweimal (Galleextrakte, R_f von Phenprocoumon = 0,60 - 0,65) entwickelt. Nachdem unverändertes, nichtmarkiertes Phenprocoumon durch Fluoreszenzlöschung unter einer UV-Lampe (Wellenlänge 254 nm) lokalisiert war, wurde die Verteilung der Radioaktivität auf der Platte mit einem Packard Radiochromatogramm Scanner Modell 7201 (Packard Instruments Company, Downers Grove, Ill., USA) detektiert (Bedingungen: Spannung 970 V, Gasfluß des Helium-Isobutan-Gemisches $300\text{ cm}^3/\text{Min.}$, Geschwindigkeit $0,5\text{ cm}/\text{Min.}$, Fensterbreite 2 mm, lineare Verstärkung $1 \cdot 10^3$, Zeitverzögerung 3 Sekunden) und halbquantitativ mit einem Schreiber aufgezeichnet.

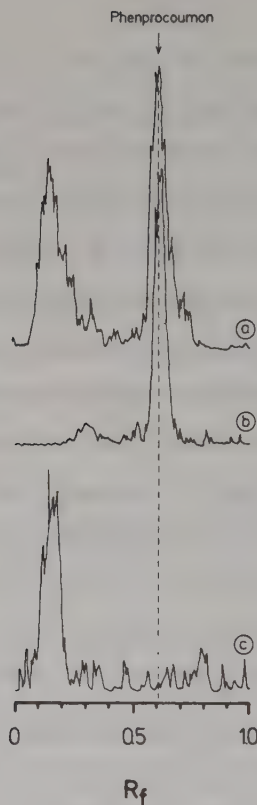


Abb. 23: Halbquantitative Radiochromatogramme von Galleextrakten nach Inkubation mit β -Glucuronidase (Bedingungen siehe Text):

- a) Extraktion mit Diäthyläther
- b) Extraktion mit n-Heptan
- c) Extraktion des wässrigen Rückstandes der n-Heptanextraktion mit Diäthyläther

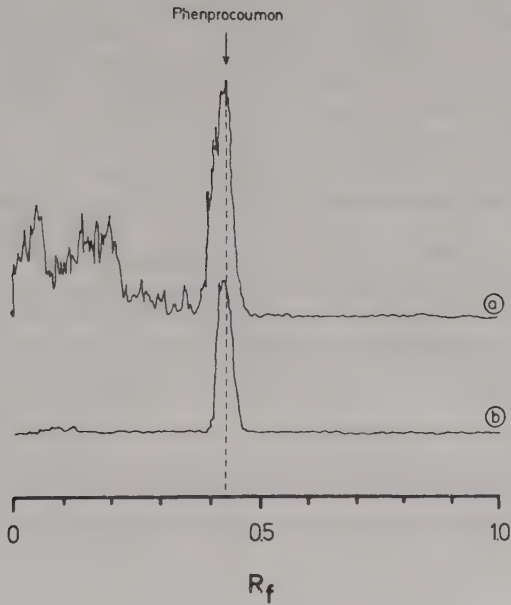


Abb. 24: Halbquantitative Radiochromatogramme von Urinextrakten nach Inkubation mit β -Glucuronidase (Bedingungen siehe Text):

- a) Extraktion mit Diäthyläther
- b) Extraktion mit n-Heptan

Dadurch konnte nachgewiesen werden (Abbildungen 23, 24), daß die Ätherextraktion Metabolite und unverändertes Phenprocoumon erfaßt, im n-Heptan-Auszug aber nur unverändertes Phenprocoumon zu finden ist. Die Metabolite bleiben im wässrigen System zurück, aus dem sie aber durch anschließende Ätherextraktion ebenfalls dargestellt werden können (Abbildungen 23, 24).

Da der Radiochromatogramm-Scanner nur eine Zählausbeute von ca. 1 % besitzt, ist eine direkte quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme nicht möglich. Dazu muß nach der Lokalisierung der Substanz mittels Fluoreszenzlöschung von Vergleichssubstanzen und Detektion der Radioaktivität mit dem Scanner das Kieselgel der betreffenden Zonen des Chromatogramms abgeschabt und durch Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie quantitativ bestimmt werden.

6.2. Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid

Da die endogenen Vitamin K₁-Spiegel äußerst niedrig sind, ist es bisher nicht möglich, diese direkt zu messen. Erst in jüngerer Zeit wurde eine gaschromatographische Methode entwickelt (Bechtold und Jähnchen, 1979), mit der es möglich ist, beim Menschen nach Einnahme von 5 mg nichtmarkiertem Vitamin K₁ die Plasmaspiegel von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid zu bestimmen. Dazu ist jedoch je Probe etwa 1 ml Plasma erforderlich, das bei wiederholten Blutentnahmen bei der Ratte in dieser Menge nicht zur Verfügung steht. Ebenso ist eine Bestimmung aus dem Leberhomogenat nicht möglich.

Daher wurde den Tieren bei Versuchsbeginn ³H-Vitamin K₁ verabreicht, das wie physiologisch vom Körper aufgenommenes Vitamin K₁ verstoffwechselt wird und daher die Untersuchung des Vitamin K₁-Stoffwechsels ermöglicht.

Die Bestimmung von ³H-Vitamin K₁ und ³H-Vitamin K₁-2,3-epoxid im Leberhomogenat erfolgte nach einer Modifikation der Methoden von Matschiner et al. (1970) und Zimmermann und Matschiner (1974).

Jeweils 0,1 ml Leberhomogenat wurden mit Wasser auf ein Volumen von 0,6 ml aufgefüllt und anschließend über 30 Minuten mit 2,0 ml eines Gemisches von n-Hexan und Propanol-(2) 3 : 1 v/v extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten/3000 U · Min.⁻¹) wurde 1 ml der Hexan-Phase abgehoben und in einem Spitzglas unter Stickstoffstrom

zur Trockne eingedampft.

Dieses Extraktionsverfahren, das auch für Plasmabestimmungen geeignet ist, bietet den Vorteil einer hohen Extraktionsrate (aus Leberhomogenat $90,9 \pm 1,2 \%$ ($n = 6$); aus Plasma $95,0 \pm 1,8 \%$ ($n = 7$), ist technisch einfach und liefert praktisch wasserfreie, nur gering mit Lipiden verunreinigte Rückstände.

Die quantitative Bestimmung erfolgte dann nach Auftrennung von Vitamin K_1 und Vitamin K_1 -2,3-epoxid durch Reversed-phase Dünnschichtchromatografie nach Matschiner et al. (1970). Dazu wurden Kieselgel-Plastikfolien mit Fluoreszenzindikator (Schichtdicke 0,2 mm) über eine Strecke von 15 cm mit Paraffin (5 % in Petroleumbenzin) beschichtet. Auf die so präparierten Platten wird die Probe nach Lösen in zweimal 25 μ l n-Hexan mit einer Kapillare aufgetragen, mit nichtmarkierten Referenzsubstanzen überschichtet, und über eine Trennstrecke von 10 cm in Aceton/Wasser 92 : 8 v/v entwickelt (R_f -Wert von ^3H -Vitamin $K_1 = 0,40$; R_f -Wert von ^3H -Vitamin K_1 -2,3-epoxid = 0,60). Nach der Detektion der Substanzen unter einer UV-Lampe (Wellenlänge 254 nm) wurden aus der Folie standardisierte Flächen (1cm x 1cm) ausgeschnitten und in ein Szintillationsgefäß gelegt, wobei die Kieselgelschicht nach oben gerichtet sein muß. Durch Auftropfen von 0,025 ml 1 N HCl auf das Kieselgel wird der Fluoreszenzindikator zerstört und damit das Auftreten einer Chemolumineszenz im Szintillations-Spektro-

meter verhindert. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 402) wurden die geschlossenen Gefäße 30 Sekunden stark geschüttelt; dadurch wurde die Substanz vom Kieselgel gelöst und messbar.

Die Wiederfindung von ^3H -Vitamin K_1 über den gesamten Analysengang betrug aus Leberhomogenat $61,1 \pm 1,9 \%$ ($n = 6$) und aus Plasma $71,2 \pm 2,2 \%$ ($n = 7$).

6.3. Tolbutamid

Die Bestimmung der Tolbutamidkonzentration im Plasma erfolgte in Proben von 0,05 ml nach der Methode von Spingler (1957).

7. Bestimmung der Proteinbindung

Die Bestimmung der Bindung von Phenprocoumon an Serum- bzw. Plasmaproteine und an Lebergewebe erfolgte mit der Gleichgewichtsdialyse.

Die Bestimmung wurde in handgearbeiteten Dialysezellen aus Plexiglas vorgenommen, die durch Einlegen einer Cellophanmembran (Union Carbide Corp., Chicago, Ill., USA) in zwei Kammern mit einem Fassungsvermögen von je 1 ml getrennt wurden.

Die Kammern wurden mit Hilfe von Tuberkulinspritzen mit aufgesetzter Kanüle Nr. 2 je nach Fragestellung mit 0,9 ml Serum/Plasma oder Leberhomogenat auf der einen Seite und in gleicher Weise mit 0,9 ml Sørensen Phosphat-Puffer auf

der anderen Seite befüllt.

Die Cellophanmembranen wurden vor der Verwendung 24 Stunden in bidestilliertem Wasser aufbewahrt. Die Dialysen selbst wurden alle bei 37° C im Wasserbad und bei 45 U . Min.⁻¹ über 16 Stunden ausgeführt.

Zur Dialyse wurde entweder frisch gewonnenes Leberhomogenat oder Serum bzw. Plasma (max. 3 Stunden bei 4° C gelagert) verwendet.

Wurde die Bindung von Phenprocoumon an Serum oder Plasma von unbehandelten Ratten bestimmt, so wurde dem Pufferanteil ein Gemisch von Phenprocoumon und ³H-Phenprocoumon (ca. 20 %) in einer Endkonzentration von 1 µg . ml⁻¹ zugesetzt.

Die Konzentration an freiem und gebundenem Phenprocoumon wurde nach Extraktion von unverändertem Phenprocoumon mit n-Heptan und anschließender Szintillationsmessung bestimmt.

Die Berechnung des freien Anteiles von Phenprocoumon erfolgte nach

$$\text{Freier Anteil} = \frac{\text{Konzentration im Puffer}}{\text{Konz. im Puffer} + \text{Konz. im Eiweiß}}$$

Allen Werten liegen Doppeldialysen zugrunde.

8. Proteinbestimmung

Gesamteiweiß

Die Bestimmung des Gesamteiweißes im Serum wurde nach der Biuret-Methode mit der Biochemica-Test-Combination "Gesamt-Eiweiß" (Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) durchgeführt.

Zu 0,1 ml Serum wurde 5 ml Biuret-Reagenz (0,1 M NaOH; 16 mM K-Na-tartrat; 15 mM KJ; 6 mM Kupfersulfat) hinzugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur 30 Minuten stehen gelassen. Die Extinktion der Probe wurde gegen den Leerwert des Biuret-Reagenzes in einem Eppendorf-Photometer 1101 M (Eppendorf Gerätebau, Nethelen und Hinz GmbH, Hamburg) in einer Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen.

Pro 10 Proben wurde jeweils ein Standard mit definiertem Gesamt-Eiweißgehalt von 7,55 g/100 ml (Lab-trol E, Merz und Dach AG, Düringen, Schweiz) mitgeführt. Die Ergebnisse wurden verworfen, wenn der errechnete Gehalt des Standards außerhalb des Vertrauensbereiches (7,05 - 8,05 g/100 ml) lag.

Albumin

Die einzelnen Proteinfractionen wurden mittels Serumelektrophorese in einer Boskamp Universal-Elektrophoresekammer (Fa. Instrumentation Laboratory Boskamp GmbH, Hersel) auf-

getrennt.

Dazu wurden je drei Sartorius Membranfolien (Best.-Nr. 112 OO BB 57/145, Fa. Sartorius, Göttingen) mit Michaelis-Puffer getränkt und überschüssige Flüssigkeit mit Löschpapier vorsichtig abgetupft. Dann wurden die Folien mit einer Spezialpinzette in die Streifenträger eingespannt, und diese in die vorher bis zur Markierung mit Michaelis-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Aus den mit 25 µl Serum gefüllten Aussparungen einer speziellen Palette wurden durch kurzes Eintauchen (1 Sekunde) eines Mehrfachstempels zwischen je zwei parallelen 4 mm langen Platindrähten insgesamt 8 Proben aufgenommen. Durch Aufsetzen auf die Streifenträger und gleichzeitiges Niederdrücken des Stempels wurden die Proben mit einem Volumen von je 0,045 - 0,055 µl auf die Cellulose-Acetat-Folien übertragen.

Die Kammer wurde geschlossen und die Elektrophorese mit Hilfe eines regelbaren Netzgerätes bei einer konstanten Spannung von 250 V und einer Anfangsstromstärke von 0,4 mA/cm Streifenbreite durchgeführt. Nach genau 24 Minuten wurden die Folien entnommen und für 5 Minuten in ein Amidoschwarz 10 B-Färbebad (Amidoschwarz 10 B 0,5 % in Methanol/Essigsäure 9 : 1) eingelegt. Danach wurden die Präparate je 4 Minuten in 3 - 4 Entfärbekammern (Entfärbelösung Methanol/Essigsäure 9 : 1) vollständig entfärbt. Sofort nach der Entnahme aus dem letzten Entfärbebad wur-

den die Folien mit einer angefeuchteten Gummiwalze luftblasenfrei auf Glasplatten aufgezogen und in ein Transparenzbad (Dioxan/Isobutanol 720 : 280) eingelegt. Nach drei Minuten wurden die Platten entnommen, Flüssigkeit ablaufen lassen und 15 Minuten im Trockenschrank bei 105⁰ C getrocknet.

Alle Entfärbelösungen, der Michaelis-Puffer und das Transparenzbad wurden ständig erneuert. Während der Elektrophorese ist das genaue Einhalten der verschiedenen Zeitspannen von entscheidender Bedeutung, nach dem Trocknen sind die Präparate haltbar und können archiviert werden.

Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit einem Zeiss Pherogramm-Photometer KFE 4 (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei einer Wellenlänge von 600 nm, einer Geschwindigkeit von 200 mm/Minute und einer Spaltgröße von 0,1 x 4 mm. Die Absorptionskurven wurden mit einem Kompensograph III-Schreiber (Fa. Siemens, Berlin) aufgezeichnet, die prozentualen Flächen unter den einzelnen Kurven mit einem Integrator des Typs digital pdp 8/e (Fa. digital equipment international ltd., Galway, Irland) errechnet und über einen Schreiber Teleprint 390 (Fa. Teleprint, Frankfurt) ausgedruckt.

9. Substanzen, Lösungsmittel und Puffer

Alle verwendeten Substanzen und Lösungsmittel waren vom Hersteller mit dem Reinheitsgrad "pro analysi" gekennzeichnet

net und wurden ausnahmslos von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

Citrat-Puffer

Citronensäure · 1 H ₂ O	20,89 g
Dikaliumhydrogenphosphat · 3 H ₂ O	11,63 g
Wasser	ad 100,0 ml

Der gebrauchsfertige Puffer wurde durch Verdünnung dieser Stammlösung mit Wasser im Verhältnis 1 : 2,5 hergestellt und hatte einen pH-Wert von etwa 2,8.

Michaelis-Puffer

Natrium-Diäthylbarbitursäure	19,62 g
Natriumacetat	12,95 g
0,1 N Salzsäure	120,0 ml
Wasser	ad 2000,0 ml

Der gebrauchsfertige Puffer wurde durch Verdünnung dieser Stammlösung mit Wasser im Verhältnis 3 : 2 hergestellt.

Sørensen-Phosphat-Puffer

Stamm A: Kaliumdihydrogenphosphat	9,08 g
Wasser	ad 1000,0 ml
Stamm B: Dinatriumhydrogenphosphat	
· 2 H ₂ O	11,88 g
Wasser	ad 1000,0 ml

Die Stammlösungen A und B wurden so gemischt, daß der

pH-Wert des fertigen Puffers exakt 7,40 betrug.

Walpole-Acetat-Puffer

Stamm A: Essigsäure	12,00 g
Wasser	ad 1000,0 ml
Stamm B: Natriumacetat · 3 H ₂ O	27,20 g
Wasser	ad 1000,0 ml

Die Stammlösungen A und B wurden so gemischt, daß der pH-Wert des fertigen Puffers exakt 4,50 betrug.

10. Pharmakokinetische Analyse

Bezeichnungen, Symbole, Dimensionen und Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

BEZEICHNUNG	SYMBOL	DIMENSION	ERMITTLUNG
Apparente Eliminationskonstante von Phenprocoumon	k_{app}	Stunde ⁻¹	Aus dem Anstieg der Geraden einer graphischen Darstellung, in der der Logarithmus der Plasmakonzentration (Ordinate) gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen wurde.
Extrapolierte Plasmakonzentration zum Zeitpunkt Null	C_{p^0}	mg · ml ⁻¹	Der Anstieg und C_{p^0} wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt.
			- $k_{app} = \text{Anstieg} \cdot 2,303$
Biologische Halbwertszeit	$t_{1/2}$	Stunden	$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{app}}$

BEZEICHNUNG	SYMBOL	DIMENSION	ERMITTLUNG
Fiktives Verteilungsvolumen	V_d	$\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$	$= \frac{\text{i.v. injizierte Dosis}}{C_{p0}} \quad \text{oder}$ $= \frac{\text{i.v. injizierte Dosis}}{\text{Fläche } (f;g)^a \cdot k_{app} (f;g)^b}$
Plasmaclearance	Cl	$\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Stunde}^{-1}$	$Cl = k_{app} \cdot V_d \quad \text{oder}$ $Cl = \frac{\text{i.v. injizierte Dosis}}{\text{Fläche } (g)^a}$
Intrinsische Clearance ($\hat{=}$ hepatische metabolische Clearance)	Cl_{intr}	$\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Stunde}^{-1}$	$Cl_{intr} = \frac{\text{i.v. injizierte Dosis}}{\text{Fläche } (f)^a}$

a Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von freiem Phenprocoumon [Fläche (f) = $\int_0^\infty C_p \cdot dt$] bzw. Gesamtphenprocoumon [Fläche (g) = $\int_0^\infty C_p \cdot dt$], ermittelt durch numerische Integration nach der Trapezregel.

b Apparente Eliminationskonstante von freiem Phenprocoumon k_{app} (f) bzw. Gesamtphenprocoumon k_{app} (g)

BEZEICHNUNG	SYMBOL	DIMENSION	ERMITTLUNG
Initiale Konzentration von Phenprocoumon in der Leber	A_{L^0}	mg	$A_{L^0} = \frac{W_L \cdot C_{p^0} \cdot C_L / C_p}{1000}$ W_L = Lebergewicht in g C_{p^0} = extrapolierte Plasmakonzentration zum Zeitpunkt Null in mg · l⁻¹ C_L / C_p = Leber/Plasma-Konzentrationsverhältnis (Jähnchen und Levy, 1974)
Dosisanteil von Phenprocoumon in der Leber	F	-	$F = \frac{A_{L^0}}{\text{i.v. injizierte Dosis}}$ (Jähnchen und Levy, 1974)
Intrinsische Eliminationskonstante von Phenprocoumon	k_{intr}	Stunde ⁻¹	$k_{intr} = \frac{k_{app}}{F}$ (Nagashima et al., 1968; Levy und Nagashima, 1969; Levy, 1970; Jähnchen und Levy, 1974)

BEZEICHNUNG	SYMBOL	DIMENSION	ERMITTLUNG
Freier Anteil von Phenprocoumon im Körpergewebe	f_K	% der Gesamtkonzentration	$f_K = \frac{V_T \cdot f_P}{V_d - V_P}$
			V_T^C = Volumen des Gesamtkörperwassers minus Volumen des Plasmawassers
			f_P = freier Anteil von Phenprocoumon im Plasma in % der Gesamtkonzentration
			V_P^C = Volumen des Plasmawassers
			(Gibaldi und McNamara, 1977)
Freier Anteil von Phenprocoumon im Lebergewebe	f_L	% der Gesamtkonzentration	$f_L = \frac{0,7 \cdot f_S \cdot C_S}{C_L}$
			f_S = Freier Anteil von Phenprocoumon im Serum in % der Gesamtkonzentration
			C_S = Konzentration von Phenprocoumon im Serum in $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
			C_L = Konzentration von Phenprocoumon in der Leber in $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
			(Levy et al., 1978)

^C Das Volumen des Gesamtkörperwassers der Ratte wurde mit $660 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ und das Plasmavolumen mit $42 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ angesetzt (Gibaldi und McNamara, 1977);

BEZEICHNUNG	SYMBOL	DIMENSION	ERMITTLUNG
Prothrombinkomplexaktivität vor Verabreichung von Phenprocoumon	PCA^O	% der Norm	Aus der Prothrombinzeit anhand einer Eichkurve
Prothrombinkomplexaktivität nach Verabreichung von Phenprocoumon	PCA	% der Norm	Aus der Prothrombinzeit anhand einer Eichkurve
Syntheserate des Prothrombinkomplexes vor Phenprocoumoninjektion	R_{syn}^O	% der Norm • Tag ⁻¹	$R_{syn}^O = k_d \cdot PCA^O$
Syntheserate des Prothrombinkomplexes zu verschiedenen Zeitpunkten nach Phenprocoumoninjektion	R_{syn}	% der Norm • Tag ⁻¹	$R_{syn} = R_{net} + R_{deg}$ R_{net} = Änderung der Prothrombinkomplexsyntheserate mit der Zeit nach Injektion von Phenprocoumon (PCA • Zeit ⁻¹ , % der Norm • Tag ⁻¹) $R_{deg} = k_d \cdot PCA^d$, Zerstörungsräte des Prothrombinkomplexes

(Nagashima et al., 1969)

^d PCA: bei linearer Interpolation gewonnene mittlere PCA zweier aufeinanderfolgender PCA-Bestimmungen

BEZEICHNUNG	SYMBOL	DIMENSION	ERMITTLUNG
Eliminationskonstante des Prothrombinkomplexes	k_d	Tag^{-1}	Aus dem exponentiellen Abfall der Prothrombinkomplexaktivität mit der Zeit nach Verabreichung von $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Warfarine . Methode der kleinsten Quadrate
Hypothetische Plasmakonzentration von Phenprocoumon, die zu einer 50 %-igen Hemmung der Syntheserate des Prothrombinkomplexes führt	C_p	$50 \% \quad \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Aus der Geraden einer graphischen Darstellung in der $R_{\text{syn}}/R_{\text{syn}}^0$ (Ordinate) gegen den Logarithmus der Plasmakonzentration ^f (Abszisse) aufgetragen wurde. Methode der kleinsten Quadrate. Extrapolation bei $R_{\text{syn}}/R_{\text{syn}}^0 = 0,5$

e Ein mittlerer k_d -Wert von $3,2 \pm 0,2 \text{ Tag}^{-1}$ ($n = 10$) wurde bei allen Berechnungen zugrunde gelegt. (Martini und Jähnchen, 1977)

f Bei linearer Interpolation gewonnener mittlerer Plasmakonzentrationswert von freiem bzw. Gesamtphenprocoumon.

11. Statistische Auswertung

Zur statistischen Abklärung der Frage, ob zwischen zwei Parametern eine wechselseitige Abhängigkeit besteht, wurde der Korrelationskoeffizient r der beiden Parameter anhand einschlägiger Tabellen (Sachs, 1969) auf Signifikanz gegen Null überprüft. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich 0,05 war. Noch kleinere Irrtumswahrscheinlichkeiten sind besonders ausgewiesen. Zum statistischen Vergleich von Mittelwerten, die immer mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s_x$) angegeben sind, wurde der t-Test nach Student verwendet. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$. Statistisch nicht signifikante Unterschiede wurden mit NS bezeichnet.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Aggeler, P.M., O'Reilly, R.A., Leong, L., Kowitz, P.E.:
Potentiation of anticoagulant effect of warfarin by
phenylbutazone. N. Engl. J. Med. 276, 496-501 (1967)
- Alexanderson, B., Borga, O.: Interindividual differences
in plasma protein binding of nortriptyline - A twin
study. Eur. J. Clin. Pharmacol. 4, 196-200 (1972)
- Bechtold, H., Jähnchen, E.: Quantitative analysis of
vitamin K₁ and vitamin K₁-2,3-epoxide in plasma by
electron-capture gas-liquid chromatography. J. Chroma-
togr. 164, 85-90 (1979)
- Bell, R.G., Caldwell, P.T.: Mechanism of warfarin resistance.
Warfarin and the metabolism of vitamin K₁. Biochemistry
12, 1759-1762 (1973)
- Bell, R.G., Matschiner, J.T.: Warfarin and the inhibition
of vitamin K activity by an oxide metabolite. Nature
237, 32-33 (1972)
- Bell, R.G., Caldwell, P.T., Holm, E.E.T.: Coumarins and the
vitamin K - K-epoxide cycle. Lack of resistance to
coumatetralyl in warfarin-resistant rats. Biochem.
Pharmacol. 25, 1067-1070 (1976)
- Brodie, B.B.: Displacement of one drug by another from
carrier or receptor sites. Proc. R. Soc. Med. 58,
946-955 (1965)
- Caldwell, P.T., Ren, P., Bell, R.G.: Warfarin and meta-
bolism of vitamin K₁. Biochem. Pharmacol. 23, 3353-
3362 (1974)

- Carfagna, M., Krans, H.M.J., Volkers, W.S.: Studies on the heritability of the variation in TBG-activity as reflected in the resin uptake of $^{131}\text{I-T}_3$ in humans. *Acta Endocrinol.* 71, 297-312 (1972)
- Coon, W.W., Willis III, P.W.: Some aspects of the pharmacology of oral anticoagulants. *Clin. Pharmacol. Ther.* 11, 312-336 (1970)
- Gibaldi, M., McNamara, P.J.: Tissue binding of drugs. *J. Pharm. Sci.* 66, 1211-1212 (1977)
- Gugler, R., Azarnoff, D.L.: Drug protein binding in nephrotic syndrome. *Clin. Pharmacokinet.* 1, 25-35 (1976)
- Haddock, R.E., Trager, W.F., Pohl, L.R.: Biotransformation of phenprocoumon in the rat. *J. Med. Chem.* 18, 519-523 (1975)
- Hagan, E.C., Radomski, J.L.: The toxicity of 3-(acetonylbenzyl)-4-hydroxycoumarin (warfarin) to laboratory animals. *J. Am. Pharm. Assoc.* 42, 379-382 (1953)
- Holck, H.G.O., Kanan, M.A., Mills, L.M., Smith, E.L.: Studies upon the sex-difference in rats in tolerance to certain barbiturates and to nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 60, 323-346 (1937)
- Husted, S., Andreassen, F.: Individual variation in the response to phenprocoumon. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 11, 351-358 (1977)
- Jähnchen, E., Levy, G.: Relationship between distribution, elimination and anticoagulant action of dicumarol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 293-299 (1974)
- Jähnchen, E., Meinertz, T., Gilfrich, H.-J., Groth, U.: Pharmacokinetic analysis of the interaction between dicoumarol and tolbutamide in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 10, 349-356 (1976)

- Kato, R.: Sex-related differences in drug metabolism.
Drug Metab. Rev. 3, 1-32 (1974)
- Kato, R., Chiesara, E., Frontino, G.: Influence of sex difference on the pharmacological action and metabolism of some drugs. Biochem. Pharmacol. 11, 221-227 (1962)
- Koch-Weser, J., Sellers, E.M.: Drug interactions with coumarin anticoagulants. N. Engl. J. Med. 285, 487-498 und 547-558 (1971)
- Lai, C.-M., Levy, G.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XXX: Relationship between total clearance and serum protein binding of dicoumarol in rats. J. Pharm. Sci. 66, 1739-1740 (1977)
- Lai, C.-M., Levy, G.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XXXVII: Simultaneous *in vitro* displacement of dicoumarol from serum protein and tissue binding sites by tolbutamide in rats. J. Pharm. Sci. 67, 1492-1493 (1978)
- Larson, A.E., Suttie, J.W.: Vitamin K-dependent carboxylase: Evidence for a hydroperoxide intermediate in the reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5413-5416 (1978)
- Levy, G.: Effect of protein binding on the distribution and metabolism of a highly plasma protein bound drug (bishydroxycoumarin). Proceedings of the Fourth International Congress on Pharmacology, Vol. IV, pp. 150-159 (1970)
- Levy, G.: Effect of plasma protein binding of drugs on duration and intensity of pharmacological activity. J. Pharm. Sci. 65, 1264-1275 (1976)

- Levy, G., Nagashima, R.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants VI: Effect of plasma protein binding on the distribution and elimination of bis-hydroxycoumarin by rats. J. Pharm. Sci. 58, 1001-1004 (1969)
- Levy, G., Yacobi, A.: Effect of plasma protein binding on elimination of warfarin. J. Pharm. Sci. 63, 805-806 (1974)
- Levy, G., Lai, C.-M., Yacobi, A.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XXXII: Inter-individual differences in binding of warfarin and dicumarol in rat liver and implications for physiological pharmacokinetic modeling. J. Pharm. Sci. 67, 229-231 (1978)
- Loeliger, A.E.: Drugs affecting blood clotting and fibrinolysis. In: Meyler's side effects of drugs, Vol. 8 (M.N.G. Dukes, ed.), pp. 764-790, Amsterdam-Oxford: Excerpta Medica 1975
- Martini, A., Jähnchen, E.: Studies in rats on the mechanism by which 6-mercaptopurine inhibits the anticoagulant effect of warfarin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 201, 547-553 (1977)
- Matschiner, J.T., Bell, R.G., Amelotti, J.M., Knauer, T.E.: Isolation and characterization of a new metabolite of phylloquinone in the rat. Biochim. Biophys. Acta 201, 309-315 (1970)
- Nagashima, R., Levy, G., Sarcione, E.J.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants III: Factors affecting the distribution and elimination of bishydroxycoumarin (BHC) in isolated liver perfusion studies. J. Pharm. Sci. 57, 1881-1888 (1968)

- Nagashima, R., O'Reilly, R.A., Levy, G.: Kinetics of pharmacologic effects in man: The anticoagulant action of warfarin. Clin. Pharmacol. Ther. 10, 22-35 (1969)
- Nicholas, G.S., Barron, D.H.: The use of sodium amytal in the production of anaesthesia in the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 46, 125-129 (1932)
- Nicoloff, J.T., Dowling, J.T., Patton, D.D.: Inheritance of decreased thyroxine-binding by the thyroxine-binding globulin. J. Clin. Endocrinol. 24, 294-298 (1964)
- O'Reilly, R.A., Aggeler, P.M.: Determinants of the response to oral anticoagulant drugs in man. Pharmacol. Rev. 22, 35-96 (1970)
- Park, B.K., Leck, J.B., Wilson, A.C., Serlin, M.J., Breckenridge, A.M.: A study of the effect of anticoagulants on ^3H -vitamin K_1 metabolism and prothrombin complex activity in the rabbit. Biochem. Pharmacol. 28, 1323-1329 (1979)
- Pyörälä, K.: Determinants of the clotting factor response to warfarin in the rat. Ann. Med. Exp. Fenn. 43 Suppl. 3, 1-99 (1965)
- Pyörälä, K.: Sex difference in the clotting factor response to warfarin and in the rate of warfarin metabolism in the rat. Ann. Med. Exp. Fenn. 46, 23-34 (1968)
- Quick, A.J.: Hemorrhagic diseases and thrombosis, ed. 2, pp. 391, 445, Lea & Febinger, Philadelphia (1966)
- Refetoff, S., Robin, N.I., Alper, C.A.: Study of four new kindreds with inherited thyroxine - binding globulin abnormalities. Possible mutations of a single gene locus. J. Clin. Invest. 51, 848-867 (1972)

- Ren, P., Laliberte, R.E., Bell, R.G.: Effect of warfarin, phenylindanedione, tetrachloropyridinol and chloro-vitamin K₁ on prothrombin synthesis and vitamin K metabolism in normal and warfarin-resistant rats. Mol. Pharmacol. 10, 373-380 (1974)
- Ren, P., Starke, P.Y., Johnson, R.L., Bell, R.G.: Mechanism of action of anticoagulants: Correlation between the inhibition of prothrombin synthesis and the regeneration of vitamin K₁ from vitamin K₁ epoxide. J. Pharmacol. Exp. Ther. 201, 541-546 (1977)
- Routledge, P.A., Chapman, P.H., Davies, D.M., Rawlins, D.M.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin at steady state. Br. J. Clin. Pharmacol. 8, 243-247 (1979)
- Rowland, M., Matin, S.B.: Kinetics of drug - drug interactions. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1, 553-567 (1973)
- Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag (1969)
- Sadowski, J.A., Schnoes, H.K., Suttie, J.W.: Vitamin K epoxidase: Properties and relationship to prothrombin synthesis. Biochemistry 16, 3856-3863 (1977)
- Sadowski, J.A., Suttie, J.W.: Mechanism of action of coumarins. Significance of vitamin K epoxide. Biochemistry 13, 3696-3699 (1974)
- Schmidt, W., Jähnchen, E.: Stereoselective drug distribution and anticoagulant potency of the enantiomers of phenprocoumon in rats. J. Pharm. Pharmacol. 29, 266-271 (1977)

- Schmidt, W., Jähnchen, E.: Interaction of phenylbutazone with racemic phenprocoumon and its enantiomers in rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 7, 643-663 (1979)
- Schmidt, W., Beermann, D., Oesch, F., Jähnchen, E.: Differential effect of the enantiomers of phenprocoumon and warfarin on the vitamin K₁-epoxide/vitamin K₁ ratio in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 490-491 (1979)
- Sellers, E.M., Koch-Weser, J.: Kinetics and clinical importance of displacement of warfarin from albumin by acidic drugs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 179, 213-225 (1971)
- Sellers, E.M., Lang, M., Koch-Weser, J., Colman, R.W.: Enhancement of warfarin-induced hypoprothrombinemia by triclofos. *Clin. Pharmacol. Ther.* 13, 911-913 (1973)
- Shearer, M.J., McBurney, A., Breckenridge, A.M., Barkhan, P.: Effect of warfarin on the metabolism of phylloquinone (vitamin K₁): dose-response relationship in man. *Clin. Soc. Mol. Med.* 52, 621-630 (1977)
- Shepherd, A.M.M., Hewick, D.S., Moreland, T.A., Stevenson, I.H.: Age as a determinant of sensitivity to warfarin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 4, 315-320 (1977)
- Slattery, J.T., Yacobi, A., Levy, G.: Multimodal distribution of warfarin binding to protein in serum of male Sprague Dawley rats. *Life Sci.* 19, 447-452 (1976)
- Spingler, H.: Über eine Möglichkeit zur colorimetrischen Bestimmung von N-(4-Methyl-Benzosulfonyl)-N'-Butyl-Harnstoff im Serum. *Klin. Wochenschr.* 35, 533-535 (1957)

- Tishler, M., Fieser, L.F., Wendler, N.L.: Hydro, oxido and other derivates of vitamin K₁ and related compounds. J. Am. Chem. Soc. 62, 2866-2871 (1940)
- Whitlon, D.S., Sadowski, J.A., Suttie, J.W.: Mechanism of coumarin action: Significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. Biochemistry 17, 1371-1377 (1978)
- Wilkinson, G.R., Shand, D.G.: A physiological approach to hepatic drug clearance. Clin. Pharmacol. Ther. 18, 377-390 (1975)
- Willingham, A.K., Matschiner, J.T.: Changes in phylloquinone epoxidase activity related to prothrombin synthesis and microsomal clotting activity in the rat. Biochem. J. 140, 435-441 (1974)
- Wingard, L.B., Levy, G.: Kinetics of anticoagulant effect of dicumarol in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 253-260 (1973)
- Yacobi, A., Levy, G.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XIV: Relationship between protein binding, distribution, and elimination kinetics of warfarin in rats. J. Pharm. Sci. 64, 1660-1664 (1975)
- Yacobi, A., Levy, G.: Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XXI: Effect of plasma protein binding on distribution kinetics of warfarin in rats. J. Pharm. Sci. 66, 567-572 (1977)
- Zimmermann, A., Matschiner, J.T.: Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. Biochem. Pharmacol. 23, 1033-1040 (1974)

L E B E N S L A U F

Am 12. Dezember 1952 wurde ich als Kind des kaufmännischen Angestellten Herbert Trenk und seiner Ehefrau Ilse geb. Dörfler in Udenhausen, jetzt Grebenstein, geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Nauheim besuchte ich ab April 1963 die Prälat-Diehl-Schule (Gymnasium) in Groß-Gerau. Dort legte ich auch im Juni 1971 die Reifeprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ab. Im August des gleichen Jahres begann ich meine Tätigkeit als Apothekerpraktikant in der Stadt-Apotheke Rüsselsheim, die ich jedoch zum Sommersemester 1972 wegen der Zuteilung eines Studienplatzes im Fachbereich Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz aufgab.

Nach bestandenem zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung im Oktober 1975 arbeitete ich als Pharmaziepraktikant wieder für ein Jahr in der Stadt-Apotheke in Rüsselsheim. Im November 1976 bestand ich den dritten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und erhielt die Approbation als Apotheker.

Seit Januar 1977 bin ich am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz mit Untersuchungen zu meiner Dissertation beschäftigt.

Seit April 1979 bin ich verheiratet.

